

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Ingeniería de Materiales

**FUNCIONALIZACIÓN DE ESTRUCTURAS POROSAS DE
TITANIO MEDIANTE POLÍMEROS RECOMBINANTES
DE TIPO ELASTINA**



Memoria y Anexos

Autor: Núria Cadefau Fabregat
Director: José María Manero Planella
Co-Director: Jordi Guillem Martí
Convocatoria: Junio 2017

Resum

El titani és un material molt utilitzat en el camp de la biomedicina per les seves bones propietats mecàniques i la gran biocompatibilitat que presenta. Com tots els metalls, presenta un problema per a actuar com a biomaterial: el solapament de tensions. Per a reduir el mòdul elàstic del titani s'han construït mostres poroses amb la tècnica de l'impressió 3D.

El titani no presenta bioactivitat, per això s'ha biofuncionalitzat amb 4 biopolímers diferents tipo elastina (ELPs). Aquests biopolímers estan formats per fragments d'elastina i cada un té diferents motius cel·lulars per a caracteritzar funcions biològiques diferents. 1K no té cap motiu cel·lular, H3 té el motiu cel·lular DDDEE4 que afavoreix la mineralització, HRGD conté el motiu cel·lular RGD el qual promou l'adhesió i H4R4 conté els dos motius. L'adhesió dels polímers a les estructures de titani s'ha realitzat mitjançant silanització, creant un enllaç covalent entre el biopolímer i el titani.

S'han realitzat assajos *in vitro* d'adhesió després de 4h d'incubació, de proliferació, mineralització i diferenciació per a 4h, 7 dies, 14 dies, 21 dies i 28 dies d'incubació.

La caracterització cel·lular de l'assaig d'adhesió s'ha fet mitjançant microscopia electrònica de restreig (SEM), on s'ha observat que les cèl·lules més ben adherides han sigut les que es trobaven a la mostra funcionalitzada amb HRGD.

L'assaig de proliferació s'ha realitzat mesurant l'activitat de l'enzim lactat deshidrogenasa (LDH) i s'ha observat que la mostra on les cèl·lules havien proliferat més ha sigut la funcionalitzada amb HRGD.

L'assaig de diferenciació s'ha realitzat mesurant l'activitat de l'enzim fosfat alcalina (ALP) i s'ha observat que les cèl·lules que han diferenciat més als 14 dies d'incubació han sigut les que es trobaven a les mostres funcionalitzades amb H3.

L'assaig de mineralització s'ha realitzat amb Alizarin Red-S (AR-S) i la mostra on les cèl·lules han mineralitzat més han sigut les funcionalitzades amb H3.

Resumen

El titanio es un material muy utilizado en el campo de la biomedicina por sus buenas propiedades mecánicas y su gran biocompatibilidad. Como todos los metales, presenta un problema para actuar como biomaterial: el apantallamiento de tensiones. Para reducir el módulo elástico del titanio se han construido muestras porosas con la técnica de impresión 3D.

El titanio no presenta bioactividad, por eso se ha biofuncionalizado con 4 biopolímeros diferentes tipo elastina (ELPs). Estos biopolímeros con fragmentos de elastina y cada uno tiene diferentes motivos celulares para caracterizar funciones biológicas distintas. 1K no tiene ningún motivo celular, H3 tiene el motivo celular DDDEE4 que favorece la mineralización, HRGD contiene el motivo celular RGD que promueve la adhesión y H4R4 contiene los dos motivos. La adhesión de los polímeros a las estructuras de titanio se ha realizado mediante la silanización, creando así un enlace covalente entre el biopolímero y el titanio.

Se han realizado ensayos *in vitro* de adhesión tras 4h de incubación, de proliferación, mineralización y diferenciación para 4h, 7 días, 14 días, 21 días y 28 días de incubación. La caracterización celular del ensayo de adhesión se ha hecho mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), donde se ha observado que las células con una mejor adhesión se encontraban en la muestra funcionalizada con HRGD.

El ensayo de proliferación se ha realizado midiendo la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y se ha observado que la muestra que más ha proliferado ha sido la funcionalizada con HRGD.

El ensayo de diferenciación se ha realizado midiendo la actividad de la enzima fosfato alcalina (ALP) y se ha observado que las células que han diferenciado más a los 14 días de incubación han sido las que se encontraban en las muestras funcionalizadas con H3.

El ensayo de mineralización se ha realizado con Alizarin Red - S (AR-S) y la muestra dónde las células han mineralizado más han sido las funcionalizadas con H3.

Abstract

Titanium is a very used material in the biomedical sciences due to its great mechanical properties and its biocompatibility. As other metals, it presents stress shielding problem. To reduce the elastic modulus of titanium we have built porous scaffolds with the 3D printing method.

Titanium does not present bioactivity, and that is why it has been biofunctionalized with 4 different elastin-like polymers (ELPs). All of them contain elastine fragments and each one has different cellular motifs in order to characterize different biological functions. 1K has not cellular motifs, H3 has the DDDEE4 motif that improves mineralization, HRGD has the RGD motif that improves the adhesion and H4R4 has both motifs.

The adhesion of this biopolymers to the titanium scaffolds has been made by silanization, forming covalent bonds.

Adhesion assays in vitro have been made after 4h of incubation and proliferation, differentiation and mineralization assays after 4h, 7 days, 21 days and 28 days of incubation. The cellular characterization of the adhesion assay has been made by Scanning Electron Microscopy (SEM), where it has been observed that better adhesion happens in the scaffold functionalized with HRGD.

The proliferation assay has been made by measuring the activity of lactate deshydrogenase (LDH). After 28 days of incubation the scaffold with more proliferation was the one functionalized with HRGD.

The differentiation assay measured the activity of alkaline phosphate (ALP). After 14 days of incubation the cells that differentiate the most were the ones with the H3.

Alizarin Red-S (AR-S) has been used for the mineralization assay, and it shows that the most mineralized cells are the ones functionalized with H3.



Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Maria Pau Ginebra por dejar que hiciera las prácticas del trabajo de fin de grado en el grupo de investigación de Biomateriales, Biomecánica e Ingeniería de Tejidos (BBT).

Al Dr. José María Manero por confiar en mí, dejar que colaborara en su proyecto y ayudarme siempre que lo he necesitado.

También quiero agradecer al Dr. Jordi Guillem Martí su paciencia al enseñarme el mundo de la química y la biología, su supervisión en todos los ensayos realizados y su disposición a ayudarme en todo momento.

Gracias a Èlia Vidal por enseñarme los trucos de la impresión 3D y, aunque al principio tuvimos muchos problemas, su paciencia y positivismo fueron de gran ayuda.

Agradecimientos a la empresa AMES por llevar a cabo la sinterización de las muestras de titanio, y especialmente a Diego Torres que aparte de ayudar con la sinterización me dio muy buenos consejos.

Quiero agradecer a Isaac López su gran disposición para hacer los ensayos en el SEM cuando lo he necesitado.

Asimismo me gustaría agradecer a todos mis compañeros de laboratorio su apoyo y ayuda en todo momento.

Finalmente, agradecer a mis padres y mi hermana por su constante comprensión y ánimos en todo el proceso del trabajo.



Índice

Resum	i
Resumen	ii
Abstract	iii
Agradecimientos	v
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. OBJETIVOS	3
1.2. ALCANCE	4
2. ESTADO DEL ARTE	5
2.1. EL HUESO	5
2.2. BIOCOMPATIBILIDAD Y BIOACTIVIDAD	6
2.3. EL TITANIO PARA APLICACIONES MÉDICAS	7
2.4. TÉCNICAS DE FABRICACIÓN DE ESTRUCTURAS POROSAS	9
2.5. FUNCIONALIZACIÓN DEL TITANIO	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. MATERIALES	16
3.1.1. POLVO DE TITANIO	16
3.1.2. PLURONIC	16
3.1.3. BIOPOLÍMEROS	17
3.1.4. CULTIVO CELULAR	18
3.2. MÉTODOS	19
3.2.1. FABRICACIÓN HIDROGEL	19
3.2.2. FABRICACIÓN TINTA DE TITANIO	19
3.2.3. IMPRESIÓN 3D	19
3.2.4. SINTERIZACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS DE TITANIO	21
3.2.5. BIOFUNCIONALIZACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS DE TITANIO	21
3.2.6. CULTIVO CELULAR	24
3.2.7. ENSAYOS CELULARES <i>IN VITRO</i>	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
4.1. IMPRESIÓN 3D	30

4.2. CARACTERIZACIÓN DEL RECUBRIMIENTO MEDIANTE BIOPOLÍMEROS ELR's	31
4.3. ENSAYOS CELULARES <i>IN VITRO</i>	32
4.3.1. ENSAYO DE ADHESIÓN	32
4.3.2. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN	36
4.3.3. ENSAYO DE DIFERENCIACIÓN	38
4.3.4. ENSAYO DE MINERALIZACIÓN	42
5. ANÁLISIS DEL IMPACTO AMBIENTAL	45
5.1. GESTIÓN DE RESIDUOS	45
5.2. CONSUMO DE ENERGÍA	46
6. CONCLUSIONES	47
7. ANÁLISIS ECONÓMICO	49
REFERENCIAS	51



1. INTRODUCCIÓN

Se quiere utilizar el titanio como material para aplicaciones biomédicas, ya que presenta unas propiedades adecuadas para este campo, como son su alta biocompatibilidad, alta resistencia a la corrosión y su baja densidad comparada con otros metales.

El principal problema de los metales para este tipo de aplicaciones es su alto módulo elástico comparado con el módulo elástico del hueso. El problema que crea esta diferencia de módulos elásticos es el apantallamiento de tensiones, el cual hace que no se produzca la regeneración del hueso. Para solucionar este problema se propone construir una estructura porosa con impresión 3D.

El titanio es un material biocompatible pero no bioactivo, por lo tanto también se quiere funcionalizar las estructuras de titanio para que sean bioactivas y promuevan la osteointegración. Se han biofuncionalizado con 4 biopolímeros diferentes tipo elastina que contienen diferentes motivos celulares para obtener distintas respuestas biológicas.

Para estudiar el comportamiento de las estructuras porosas de titanio funcionalizadas con los diferentes biopolímeros se han realizado ensayos *in vitro* de adhesión, proliferación, diferenciación y mineralización para diferentes intervalos de tiempo.

1.1. OBJETIVOS

El objetivo principal de este proyecto es:

- Obtener un biomaterial que se adapte bien al tejido óseo.

Los objetivos específicos son:

- Mejorar las propiedades mecánicas del titanio
- Mejorar la interacción de las células con el titanio

1.2. ALCANCE

En este proyecto primero se explican los conceptos teóricos que se mencionan a lo largo del proyecto, los materiales y métodos utilizados en el estudio, los resultados obtenidos y su discusión, las conclusiones del proyecto, el impacto ambiental que ha podido causar y finalmente un análisis económico del proyecto.

- Estado del arte: En este primera apartado teórico se explica de forma resumida el hueso, las células que lo forman y cómo se regenera. Para situar al lector se presenta una breve definición de los conceptos de biocompatibilidad y bioactividad. Después se comentan las características que presenta el titanio, diferentes métodos de fabricación de estructuras porosas y se presentan los biopolímeros utilizados para funcionalizar las estructuras de titanio. Finalmente se discuten maneras para funcionalizar el titanio.
- Materiales y métodos: En esta parte se describen los materiales utilizados y los métodos seguidos para el estudio.
- Resultados y discusión: Se presentan los resultados obtenidos a partir de los ensayos realizados y se hace un análisis de los mismos.
- Conclusiones: En este apartado se resume lo visto a lo largo del proyecto y especialmente en los resultados.
- Impacto medioambiental: Se valora los posibles impactos que ha tenido el proyecto sobre el medio ambiente y el reciclaje de los materiales utilizados.
- Análisis económico: Finalmente se hace un estudio del coste del proyecto tanto en materiales como en técnicas utilizadas y horas invertidas.

2. ESTADO DEL ARTE

2.1. EL HUESO

El hueso está formado por el tejido óseo, cartílago, tejido conectivo denso, epitelio, tejido adiposo y tejido nervioso. El tejido óseo padece continuamente formación de nuevo tejido óseo y destrucción del hueso precedente.

El hueso está formado por una matriz extracelular donde se encuentran células muy separadas entre sí. La matriz osteoide está constituida por un 15% de agua, un 30% de fibras colágenas y un 55% de sales minerales cristalizadas. La sal mineral más abundante es el fosfato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), que se combina con otra sal mineral, el hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), para formar los cristales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). A medida que se van formando, también se combinan con otras sales minerales, como el carbonato de calcio (CaCO_3) y con iones como el magnesio, flúor, potasio y sulfato.

Cuando estas sales se depositan en las estructuras de fibra de colágeno de la matriz osteoide, estas sales se cristalizan y el tejido se endurece. Este proceso se denomina calcificación, y lo inician las células productoras de hueso llamadas osteoblastos.

El tejido óseo está constituido por cuatro tipos celulares:

- Células mesenquimales: Son células madre que derivan del mesénquima. Son las únicas células óseas que experimentan diferenciación celular, las células se pueden transformar en osteoblastos.
- Osteoblastos: Son las células formadoras de hueso que sintetizan y secretan fibras colágenas y otros componentes orgánicos necesarios para construir la matriz osteoide e inician la calcificación. A medida que se rodean de matriz osteoide van quedando atrapados y se convierten en osteocitos.

- Osteocitos: Son las células principales del hueso que mantienen el tejido óseo. Estas células mantienen el metabolismo del hueso a través del intercambio de nutrientes y productos metabólicos con la sangre.
- Osteoclastos: Son células gigantes que derivan de la fusión de al menos 50 monocitos (una clase de glóbulo blanco) y se agrupan en el endocito. Estas células liberan poderosas enzimas lisosómicas y ácidos que digieren los componentes minerales y proteicos de la matriz osteoide subyacente. Esta descomposición de la matriz osteoide, denominada resorción, es parte de la formación, el mantenimiento y la reparación normales del hueso.

Existen dos tipos de tejido óseo: el tejido óseo compacto y el tejido óseo esponjoso.

El tejido óseo compacto contiene pocos espacios y es el componente más fuerte del tejido óseo. Aproximadamente un 80% del esqueleto está formado por hueso compacto. Se compone de osteonas y cada una consta de un conducto central alrededor del cual se dispone una serie de laminillas concéntricas.

El tejido óseo esponjoso no contiene osteonas, está compuesto por laminillas dispuestas en un patrón irregular de finas columnas denominadas trabéculas, entre las que existen espacios que pueden apreciarse a simple vista. Aproximadamente un 20% del esqueleto está formado por hueso esponjoso [1].

En cuanto a propiedades mecánicas el tejido óseo presenta un módulo elástico E que puede variar entre 2 y 20 GPa [2].

2.2. BIOCOMPATIBILIDAD Y BIOACTIVIDAD

La biocompatibilidad se refiere a la capacidad de un biomaterial para realizar la función para la que ha sido diseñado, con respecto a una terapia médica, sin producir ningún efecto local o sistémico indeseado en el receptor de dicha terapia, pero generando la respuesta celular o tisular más apropiada en dicha situación específica, y optimizando el rendimiento de dicha terapia [3].

La biocompatibilidad implica bioseguridad y la biofuncionalidad; La bioseguridad significa que el material no debe causar efectos nocivos en el organismo, como la inflamación crónica, infección, trombogénesis y no debe ser tóxico ni en su forma primaria ni en sus productos de degradación.

La biofuncionalidad es la necesidad de un material de ser capaz de desencadenar una respuesta benéfica del organismo receptor para el funcionamiento óptimo del dispositivo médico.

Los materiales bioactivos producen unas acciones y reacciones controladas en el entorno fisiológico, ayudando a la regeneración de tejidos.

Los biomateriales son conocidos por su alta biocompatibilidad pero carecen de bioactividad. Para activarlos es necesario modificar la superficie introduciendo moléculas biológicamente relevantes. Hoy en día hay mucha investigación para bioactivar los biomateriales y obtener una respuesta biológica mejor, algunos de los métodos son: recubrimientos de hidroxiapatita, adsorción de proteínas, recubrimientos con péptidos o polímeros que contienen secuencia RGD o la ingeniería de tejidos óseos en la que el biomaterial son las células óseas.

2.3. EL TITANIO PARA APLICACIONES MÉDICAS

El titanio es un material muy utilizado en el campo de la biomedicina gracias a sus propiedades, entre las que destacan su gran resistencia a la corrosión y su gran biocompatibilidad.

Presenta gran resistencia a la corrosión porque es un material que reacciona con el oxígeno muy rápidamente, creando una capa superficial protectora que impide que el material se oxide o se corroa. Este proceso es conocido como pasivación [4, 5].

El titanio es un material bioinerte, es decir que no presenta toxicidad. El único problema es que no es bioactivo, por esta razón en este proyecto se propone biofuncionalizarlo con polímeros que promueven la bioactividad.

A continuación se presentan otras propiedades del titanio (**Tabla 1**).

Tabla 1. Propiedades del titanio

Propiedad	Valor
Densidad (g/cm ³)	4,7
Módulo elástico (GPa)	110
Límite elástico (0,2%) (MPa)	170-485
Carga de rotura (MPa)	240-550
Elongación (%)	15-24
Estricción (%)	25-30

Cómo se puede ver en la **Tabla 1** la densidad del titanio es relativamente baja (4,7 g/cm³) comparada con otros materiales utilizados en el campo de la medicina como el acero inoxidable (7,9 g/cm³) o las aleaciones de cobalto (8-9 g/cm³).

Las propiedades mecánicas que presenta son inferiores a otros metales utilizados, pero sus propiedades específicas son superiores al acero inoxidable y aleaciones base cobalto gracias a su baja densidad.

Una de las propiedades más interesantes es su módulo elástico (110 GPa), inferior al del acero inoxidable (200 GPa) y al de las aleaciones de cobalto (220 GPa). Interesa que el módulo elástico sea lo más pequeño posible, ya que el módulo elástico del hueso es de unos 20 GPa [5, 6].

Esta diferencia tan grande entre el módulo elástico del hueso y el módulo elástico del biomaterial provoca un defecto llamado apantallamiento de tensiones.

El apantallamiento de tensiones hace que todas las cargas las absorba el material con un módulo elástico mayor, es decir, el biomaterial implantado. Como consecuencia, al no haber cargas estimulantes en el hueso, no se produciría la regeneración ósea [6].

Es por eso que se plantea construir estructuras porosas de titanio, así el módulo elástico del titanio se parecería más al del hueso.

2.4. TÉCNICAS DE FABRICACIÓN DE ESTRUCTURAS POROSAS

Existen diferentes técnicas para la fabricación estructuras porosas, como por ejemplo:

- **Space holder method:** Este método de fabricación de estructuras porosas se ha utilizado mucho para obtener estructuras de metal para aplicaciones biomédicas [7]. Se divide en 4 pasos principales (*Figura 1*):

- 1) Mezcla del polvo de metal con las partículas "space-holding".
- 2) Compactación de los materiales granulares.
- 3) Eliminación de las partículas "space-holding".
- 4) Sinterización de las estructuras porosas.

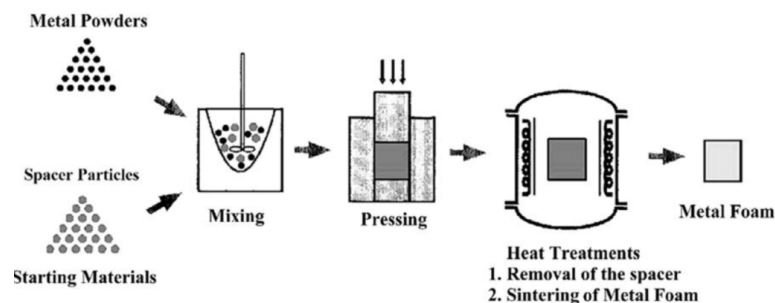


Figura 1. Proceso de Space Holder Method [8].

- **Selective Laser Sintering (SLS):** Éste método de fabricación permite obtener muestras 3D con formas complejas generando capas sucesivas de polvo de metal una encima de la otra. Se utiliza energía térmica suministrada por un haz de rayo láser. Deflectando este haz con espejos galvánicos, cada capa se escanea a partir de un archivo CAD del modelo (*Figura 2*).

Para evitar la oxidación del material este proceso se realiza en una cámara de gas inerte, como el argón o el nitrógeno.

El grosor de estas capas es de 20 μm a 150 μm normalmente [9], [10].

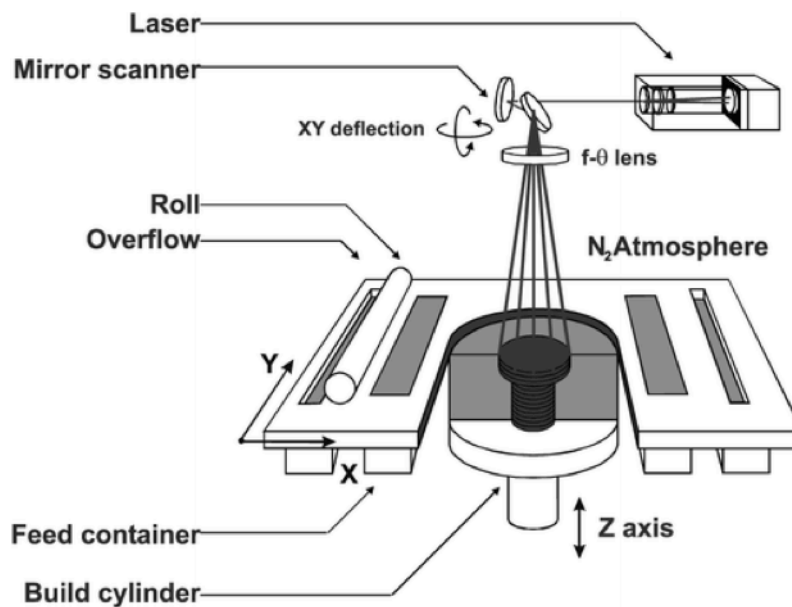


Figura 2. Proceso de SLS [10].

- **Electron Beam Melting (EBM):** Éste método es muy parecido al SLS explicado anteriormente. El polvo de metal es fundido por un haz de electrones capa por capa siguiendo las instrucciones de archivos CAD con el modelo que se quiere construir. En este caso el haz de electrones es deflectado por lentes electromagnéticas, así se consiguen velocidades de fabricación y una gran precisión en la fundición (*Figura 3*). Este proceso hace en el vacío y de esta manera no se produce ninguna degradación del material debido a los gases atmosféricos y se consiguen mejores propiedades [11].

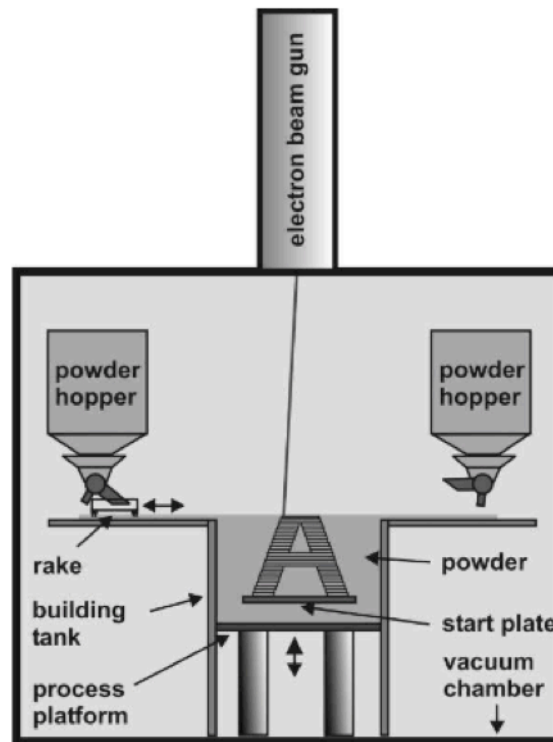


Figura 3. Proceso de EBM [11].

- **3D Printing:** Esta tecnología permite crear estructuras complejas directamente desde datos CAD. Las estructuras se forman añadiendo capas finas de material. Primero se tiene que diseñar la estructura 3D con un programa CAD que la defina perfectamente y transformarla a formato STL ya que casi todas las impresoras 3D trabajan con archivos STL. Al transferir los archivos a la impresora 3D se tiene que ajustar la posición y la orientación para empezar a construir. Después se tiene que introducir los parámetros que se quieran para fabricar la estructura deseada, como el grosor de las capas, tiempo, propiedades del material, etc. El proceso de fabricación es casi automático, ya que la máquina empezará a construir ella misma una vez introducidos todos los parámetros, solo se tiene que vigilar que haya suficiente material para la fabricación completa de la pieza. Una vez acabada de construir simplemente se saca de la impresora y si es requerido se harán tratamientos de limpieza o superficiales a la pieza dependiendo de su aplicación [12].

Se necesita una porosidad de entre un 60 - 80% y un tamaño de poro alrededor de 100 μm para que las células puedan introducirse dentro de la estructura. Otro factor

importante es que los poros estén interconectados para que los nutrientes puedan fluir a través de la estructura.

Para conseguir estas condiciones de estructura porosa el único método que lo proporciona es el 3D Printing, por esta razón se ha utilizado el método de impresión 3D para la fabricación de las estructuras porosas de titanio.

2.5. FUNCIONALIZACIÓN DEL TITANIO

Como se ha comentado anteriormente el titanio es un material bioinerte, y en los biomateriales se busca la mejor interacción entre la célula y el biomaterial para favorecer la regeneración de tejidos. Por eso hay mucha investigación en mejorar la bioactividad de los biomateriales metálicos. Algunas de las maneras para bioactivar estos materiales es a través de la modificación de la superficie introduciendo moléculas biológicamente relevantes como proteínas o fragmentos de ellas. Algunos de estos métodos son:

Recubrimientos con proteínas

Una de las primeras soluciones que apareció para mejorar la interacción de la célula con el biomaterial es recubrir el material adsorbiendo proteínas, que forman la matriz extracelular, en su superficie como colágeno, fibronectina, ácido hialurónico o sialoproteína ósea [13], [14]. Las proteínas actualmente consideradas para la modificación química superficial de materiales son los factores de crecimiento y las proteínas de adhesión. De entre los factores de crecimiento relacionados con el hueso, cabe destacar la familia- β , y entre ellos, los TGF- β 1 y las proteínas morfogenéticas del hueso BMP-2 y BMP-7. Estos recubrimientos tienen como principal inconveniente la desnaturalización de las proteínas ya que dejan de ser efectivas y puede haber rechazo [15]. Además, tienen baja solubilidad, son costosos de extraer y purificar en grandes cantidades, sufren de variación de lote a lote y potencialmente sufren de inmunogenicidad. Este hecho hace que se investiguen otros tipos de recubrimientos.

Recubrimientos con Péptidos

Como solución a estos problemas aparece la siguiente vía de investigación que tiene como objetivo cubrir la superficie con péptidos o fragmentos de proteínas que contengan las secuencias bioadhesivas que tenían las proteínas de la anterior vía de investigación.

Las ventajas de utilizar péptidos sintéticos es el control más preciso que se obtiene de su composición química y de su inmovilización sobre una superficie bioinerte. Debido al alto peso molecular de las proteínas, los péptidos son más resistentes a la desnaturalización cuando se ven sometidos a cambios de pH y al calor.

Schaffner et al. [16] reportaron que la secuencia RGD se expresa en muchas de las moléculas de la matriz extracelular, y son responsables del anclaje celular.

Biopolímeros tipo elastina (ELPs)

La elastina es una proteína natural de la matriz extracelular responsable de las propiedades elásticas de los tejidos y órganos de los vertebrados. Se encuentra presente en las zonas donde se requiere elasticidad y resiliencia tales como arterias, ligamentos, tendones, pulmones, piel y cartílago elástico. Se trata de un polímero amorfo con un peso molecular de 70 kDa. El interés por esta proteína estructural en el campo de los biomateriales viene de sus excelentes propiedades de elasticidad, auto-montaje, larga estabilidad ($t_{1/2} = 70$ años) y actividad biológica. Está formada por una cadena de aminoácidos con dos regiones: una hidrofóbica constituida por los aminoácidos apolares, valina (V), prolina (P) y glicina (G), y otra hidrofílica con los aminoácidos lisina (K) y alanina (A). La región hidrofóbica es la que confiere la elasticidad característica a la elastina. Aproximadamente el 90% de sus aminoácidos son de cadena lateral apolar y existen ciertas secuencias que se encuentran repetidas como VPG, VPGG, GVGVP, IPGVG, VAPGVG. La más común es la secuencia GVGVP, que aparece en fragmentos que contienen hasta 11 pentapéptidos consecutivos (VPGVG)¹¹.

La elastina posee la habilidad de sufrir una gran deformación sin romperse y la recuperación posterior de la disposición original cuando el esfuerzo ha terminado, además de una gran resistencia a la fatiga. Intercaladas entre las fibras de elastina, se

encuentran largas fibras de colágeno, inelásticas, que limitan la extensión de la fibra, previniendo así que el tejido se desgarre.

Los polímeros tipo elastina (ELPs) son un nuevo tipo de polímeros proteicos. Todos ellos están basados en la recurrencia de los motivos que son considerados “bloques de construcción” en la elastina natural. La composición más común es poli(VPGXG), en el que X representa un aminoácido natural a excepción de la prolina. En función de ese aminoácido, el polímero tendrá unas propiedades físico-químicas u otras [17]. La gran mayoría de los ELPs sintéticos se sintetizan a partir de modificaciones de ese pentámero, sustituyendo uno o más aminoácidos del pentámero original por otros naturales o modificados.

Mediante la tecnología de ADN recombinante molecular se puede diseñar y sintetizar materiales utilizando las funciones de las proteínas naturales. Estos polímeros sintetizados mediante técnicas de Ingeniería genética son denominados como **recombinámeros tipo elastina**, ELRs. Los ELRs conservan las propiedades extraordinarias de la elastina, como son: biocompatibilidad, biodegradabilidad, capacidad de autoensamblado y bioactividad; capaces de sustituir y regenerar un tejido dañado. Además, estos polímeros presentan una naturaleza inteligente al tener la capacidad de respuesta ante estímulos como la temperatura, el pH o la radiación luminosa [18].

Todos los ELPs funcionales muestran la denominada Temperatura de Transición Inversa (TTI). Por debajo de la TTI, las cadenas poliméricas se encuentran en estado de desorden conformacional, en el que la cadena está extendida con disposición al azar. El polímero es soluble y da lugar a disoluciones transparentes debido a la hidratación hidrófoba. Al aumentar la temperatura de la disolución por encima de la TTI, el polímero sufre un cambio de estado, se pliega y ensambla adoptando una disposición ordenada, regular y no aleatoria conocida como espiral β . En este estado, el polímero comenzará a formar agregados, que precipitarán de la disolución. La temperatura de transición en los polímeros tipo elastina, suele ser cercana a la temperatura ambiente o fisiológica, y dependerá de diferentes factores: efectos de las sales disueltas, efectos de la presión,

concentración de la disolución, secuencia de aminoácidos del ELR, longitud de cadena, variación de pH, cambios en el grado de ionización de las cadenas laterales.

La versatilidad de diseño de los ELRs conjuntamente con su buena biocompatibilidad y bioactividad, hace que los ELRs se hayan utilizado en una amplia variedad de aplicaciones, tales como ingeniería de tejidos, liberación de fármacos e imagen médica, nanofibras, nanopartículas, películas, micelas, agregados o superficies biofuncionalizadas [19].

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. POLVO DE TITANIO

Se utilizó polvo de titanio, -325 mesh, 99,5% (Alfa Aesar, CAS 7440-32-6).

3.1.2. PLURONIC

El copolímero Amphiphilic poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO), más conocido como Polaxamers o Pluronics se pueden encontrar en diferentes pesos moleculares cambiando sus propiedades y son muy utilizados en la industria para diferentes aplicaciones.

Una de las variedades de pluronic es el Pluronic F127. Se trata de un material termosensible, que está presente en forma líquida a bajas temperaturas y en gel semisólido a altas temperaturas. Este comportamiento de transición reversible del F127 ha sido muy utilizado en el campo de la liberación de fármacos [20], [21].

Para la fabricación del hidrogel se utilizó polvo de pluronic F127 al 30% en peso.

El Pluronic F127 es un material óptimo para la bioimpresión 3D debido a su biocompatibilidad, su comportamiento termosensible reversible gelificante entre 10 - 40°C, su capacidad de adhesión en superficies y su amplio rango de viscosidades a temperatura ambiente [22]. A continuación se muestra la estructura química del pluronic F127 (*Figura 4*).

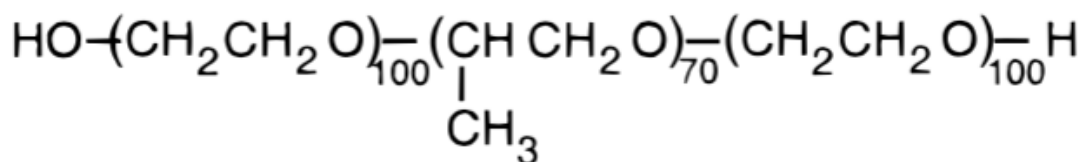


Figura 4. Estructura química del pluronic F127 [21].

3.1.3. BIOPOLÍMEROS

Se han utilizado polímeros tipo elastina sintetizados mediante técnicas de ingeniería genética (ELRs) para aumentar la bioactividad del material y han sido proporcionados por el grupo BIOFORGE de la Universidad de Valladolid. Todos ellos presentan unas propiedades muy interesantes, como su bajo módulo elástico y una elongación de rotura muy similar a la de la elastina.

Como ya se ha comentado anteriormente, la elastina está formada por una cadena de aminoácidos con dos regiones: una hidrofóbica constituida por los aminoácidos apolares, valina (V), prolina (P) y glicina (G), y otra hidrofílica con los aminoácidos lisina (K) y alanina (A). La región hidrofóbica es la que confiere la elasticidad característica a la elastina. Aproximadamente el 90% de sus aminoácidos son de cadena lateral apolar y existen ciertas secuencias que se encuentran repetidas como VPG, VPGG, GVGVP, IPGVG, VAPGVG. La más común es la secuencia GVGVP, que aparece en fragmentos que contienen hasta 11 pentapéptidos consecutivos (VPGVG)₁₁.

El pentapéptido VPGIG procedente de la elastina natural aporta al biopolímero las características elastoméricas y elevada biocompatibilidad anteriormente mencionadas. En el monómero el dominio más repetido es el pentapéptido VPGIG seguido del pentapéptido VPGKG, donde se sustituye una Isoleucina por una Lisina [17] (**Figura 5**).

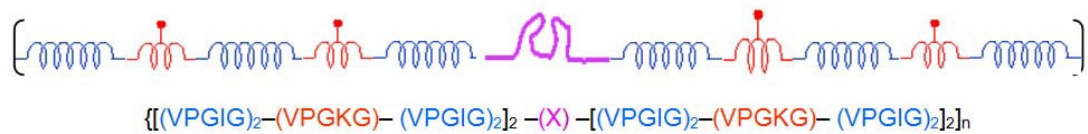


Figura 5. Secuencias de los biopolímeros [17].

Donde:

(**VPGIG**): es la matriz y aporta unas propiedades mecánicas comparables a las de la matriz extracelular.

(**VPKGK**): es una variante de la secuencia anterior. Se ha sustituido la isoleucina (I) por una lisina (K). El grupo amina (NH₂) que contiene la lisina servirá para entrecruzarse con la superficie del material, manteniendo las propiedades elásticas de la elastina.

(**X**): Cada biopolímero contiene un motivo celular diferente para caracterizar su comportamiento biológico. El biopolímero HRGD contiene el motivo celular AVTGRGDSPASS, el biopolímero H3 contiene el motivo celular **DDDEEKFLRRIGRFG**, el H4R4 contiene el motivo celular AVTGRGDSPASS y **DDDEEKFLRRIGRFG**, y el biopolímero 1K es de control y no contiene ningún motivo celular, sólo secuencias de elastina.

Los biopolímeros utilizados en este proyecto son los que se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Características de los biopolímeros utilizados.

Biopolímero	Dominio	¿Qué promueve?
1K	Control	-
H3	DDDEE4 (Hidroxiapatita)	Mineralización
HRGD	RGD	Adhesión
H4R4	4 dominios RGD + DDDEE4 (nucleación hidroxiapatita)	Adhesión + Mineralización

3.1.4. CULTIVO CELULAR

Las células que se han utilizado en los ensayos in vitro han sido células mesenquimales de rata (rMSCs). Las células se han cultivado en medio Advanced DMEM suplementado con 2mM L-glutamina, penicilina/estreptomicina (50U/ml y 50µg/ml,

respectivamente), 20 mM HEPES y 10% de suero bovino fetal (FBS). Todos los componentes de Life Technologies.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. FABRICACIÓN HIDROGEL

Para la fabricación del hidrogel de pluronic se utilizó pluronic al 30% con agua destilada. Por lo tanto se mezcló 30g de pluronic con 100 mL de agua destilada. Se mezcló al SpeedMixer a 3500 min^{-1} durante 9 minutos.

3.2.2. FABRICACIÓN TINTA DE TITANIO

La caracterización de la tinta de titanio para la impresión 3D ya estaba definida en anteriores estudios del grupo y se había visto que la proporción idónea a utilizar es 3,33g de polvo de titanio con 1,5g de hidrogel de pluronic. Para que quedara la viscosidad perfecta se mezclaron 6,66g de polvo de titanio con 3g de hidrogel de pluronic. La mezcla se hizo en un SpeedMixer a 3500 min^{-1} durante 1 min y después 30s más.

3.2.3. IMPRESIÓN 3D

Para la impresión 3D de las estructuras de titanio se ha utilizado una impresora BCN3D+ Paste Caster (**Figura 6**). Tal y como diseñó Diego Torres en el trabajo de fin de máster "Desarrollo y biofuncionalización de una estructura porosa de titanio obtenida mediante impresión 3D", se ha utilizado un software de diseño asistido por computadora (CAD), en este caso SolidWorks, para diseñar las diferentes geometrías de las piezas. El fichero se guardaba en formato STL y mediante el software Slic3r se obtiene el archivo en formato g-code que corresponde al lenguaje de la impresora.

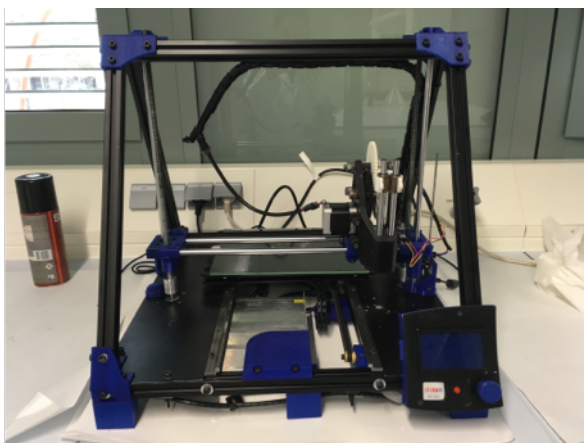


Figura 6. Impresora BCN3D+ Paste Caster.

En el g-code se almacena la secuencia de código que describe los puntos en el espacio tridimensional que trazará el extrusor para imprimir la pieza. Además, también indica otros parámetros como: velocidades de impresión, altura de capa, densidad de llenado, entre otros. La placa electrónica reconoce y ejecuta la secuencia de código implementada en estos archivos g-code [23].

Los parámetros utilizados se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Parámetros utilizados para la impresión 3D [23].

Parámetro	Valor	Unidad
Altura de capa (<i>Layer height</i>)	0.35	mm
Altura de la primera capa (<i>First layer height</i>)	100	%
Evitar cruzar perímetros (<i>Avoid crossing perimeters</i>)	activado	-
Densidad de llenado (<i>Fill density</i>)	45	%
Patrón de llenado, o estructura (<i>Fill pattern</i>)	ortogonal	-
Velocidad de llenado/impresión (<i>Infill speed</i>)	10	mm/s
Velocidad de desplazamiento (<i>Travel speed</i>)	20	mm/s
Velocidad de la primera capa (<i>First layer speed</i>)	100	%
Impresión pieza a pieza (<i>Complete individual objects</i>)	activado	-
Diámetro de la jeringa (<i>Diameter</i>)	9,55	mm
Diámetro interno boquilla (<i>Nozzle diameter</i>)	0,41	mm

El procedimiento seguido en la impresión fue el siguiente:

- 1) Fabricación de la tinta de titanio con hidrogel de pluronic.
- 2) Rellenar una jeringa de 3cc.
- 3) Ajustar la impresora modificando los parámetros "Move axis" y "Autohome".
- 4) Indicar el fichero de impresión con "flow" de 140 y "speed" de 130%.
- 5) Retirar las muestras y dejar secar al aire.

Se imprimieron un total de 92 muestras.

3.2.4. SINTERIZACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS DE TITANIO

Una vez impresas las muestras de titanio, se sinterizaron en la empresa Aplicaciones de Metales Sinterizados S.A. (AMES). El ciclo térmico para la sinterización tiene una duración de 3h a una temperatura de 1350°C en alto vacío para evitar la oxidación del titanio.

La eliminación del hidrogel se realizó a una temperatura de 300°C.

3.2.5. BIOFUNCIONALIZACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS DE TITANIO

Como ya se ha comentado anteriormente, el titanio es un material que no presenta bioactividad. Por eso se ha funcionalizado con un proceso de activación de la superficie, se ha aplicado una silanización y finalmente se ha biofuncionalizado con la adición de diferentes biopolímeros.

3.2.5.1. ACTIVACIÓN DE LA SUPERFÍCIE

Se activó la superficie de las estructuras de titanio con un tratamiento de plasma de oxígeno. Este proceso se hace para eliminar las impurezas que hayan podido quedar en las muestras y crear grupos hidroxilo (OH⁻) (*Figura 7*) para que puedan reaccionar con

los grupos silano que se añadieron posteriormente y que se explica a continuación [24]. El tratamiento de plasma de oxígeno se aplicó durante 10 minutos para 5 muestras.

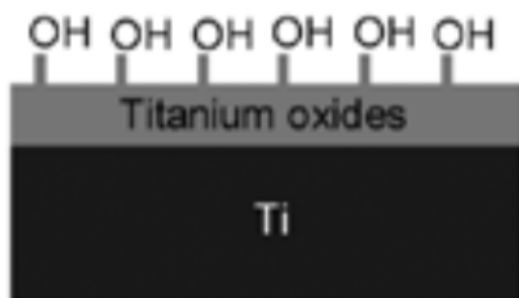


Figura 7. Esquema de la activación de la superficie por plasma de oxígeno [24].

3.2.5.2. SILANIZACIÓN

Una vez activada la superficie con grupos hidroxilo, se realizó un tratamiento de silanización. Los grupos hidroxilo se desplazan a los grupos alcoxi en el silano formando un enlace covalente -Si-O-Si- [25]. Así quedaron adheridos covalentemente los biopolímeros a las muestras de titanio.

El protocolo de silanización que se llevó a cabo fue el siguiente:

- 1) Lavar un erlenmeyer con agua y acetona y secar con nitrógeno.
- 2) Poner las estructuras dentro del erlenmeyer con una barra magnética y cerrarlo con un tapón de goma.
- 3) Hacer el vacío dentro del erlenmeyer durante 1 minuto aproximadamente.
- 4) Llenar el erlenmeyer con N_2 .
- 5) Silanizar con 3-cloropropiltrietoxisilano (CPTES): Añadir 10 mL de tolueno anhídrido, 0,1 mL de N, N-diisopropiletilamina (DIEA) y 0,2mL de 3-cloropropiltrietoxisilano (CPTES).
- 6) Dejar la mezcla en un agitador magnético a una temperatura de 70°C durante 1 hora.

- 7) Después sumergir las muestras en tolueno y sonicar en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos.
- 8) Lavar las muestras con tolueno (x3), acetona (x1), isopropanol (x3), H₂O (x3), etanol (x3), acetona (x3) y secar con N₂.
- 9) Poner las muestras en un plato de petri y dejar a una temperatura de 120°C durante 5 minutos.

En la **Figura 8** se muestra un esquema de la funcionalización de las muestras de titanio.

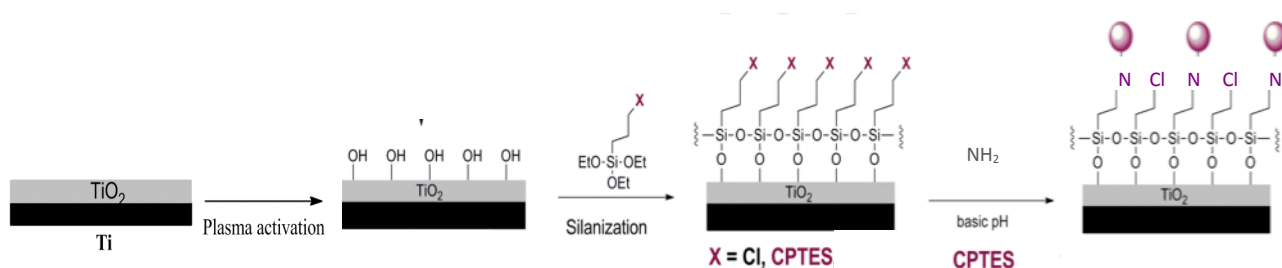


Figura 8. Activación de la superficie con plasma de oxígeno seguido de silanización con CPTES [23].

3.2.5.3. DISOLUCIÓN DE LOS BIOPOLÍMEROS

Los biopolímeros se disolvieron en PBS.

El PBS se preparó mezclando una pastilla de PBS con 500 mL de agua destilada.

Se mezcló cada biopolímero de la manera siguiente: 10mL de PBS con 5mg de biopolímero y se le añadió 3 gotas de Na_2CO_3 0,5M para mantener el pH de la disolución básico, entre 10 y 13 [23].

Para su disolución completa se dejó la mezcla unos 5min en un agitador magnético.

Para la biofuncionalización de las estructuras porosas de titanio simplemente se le añadió el biopolímero disuelto en una cantidad de 0,8 mL, lo suficiente para que

quedaran las muestras sumergidas, y se dejaron con el biopolímero a temperatura ambiente toda la noche.

3.2.6. CULTIVO CELULAR

Cómo ya se ha mencionado anteriormente, se han utilizado células rMSCs para realizar los ensayos in vitro. El medio que se ha utilizado para su cultivo ha sido Advanced DMEM con L-Glutamina, Penicilina/Estreptomicina, HEPES y FBS. Las cantidades de cada componente están descritas en el apartado "Materiales".

Las células se han incubado a 37°C con un 5% de dióxido de carbono (CO₂) y un 95% de humedad relativa.

Una vez sembradas las células en las estructuras de titanio se cambiaba el medio de cultivo por uno nuevo cada dos días

3.2.7. ENSAYOS CELULARES *IN VITRO*

3.2.7.1. ENSAYO DE ADHESIÓN

Se sembraron las células con el medio de cultivo sin FBS en cuatro muestras diferentes (una con cada tipo de biopolímero) y estuvieron en la incubadora a 37°C durante 4 horas. Después se aplicó el protocolo para preparar las muestras para estudiar en el microscopio electrónico de barrido (SEM).

Para poder analizar las muestras por SEM se siguió el siguiente protocolo:

1) Preparación de fosfato de sodio 0,1M

- Mezclar 1:1 NaH₂PO₄ 0,2M (monobásico) con Na₂HPO₄ 0,2M (dibásico).
- El pH final es 7,4.

2) Fijar las células con glutaraldehyde al 2,5% en PB 0,1M durante 1h a una temperatura de 4°C.

3) Lavar las muestras tres veces con PB a temperatura ambiente (3x10 min).

4) Deshidratar las células con lavados de etanol:

- Etanol al 50% en agua destilada durante 15 minutos.
- Etanol al 70% en agua destilada durante 15 minutos.
- Etanol al 90% en agua destilada durante 15 minutos.
- Etanol al 96% en agua destilada durante 15 minutos.
- Etanol absoluto durante 15 minutos.

5) Deshidratar completamente las células con hexamethyldisilazane (HMDS) durante 15 minutos.

6) Dejar secar al aire las muestras a temperatura ambiente hasta que se haga el estudio por SEM.

Una vez seguido el protocolo se analizó la superficie al SEM, y para ver si habían entrado células dentro de la estructura porosa se sumergieron en nitrógeno líquido durante 1 minuto aproximadamente, lo que provoca que el titanio se fragilice. Entonces se sacó y con un golpe seco con un martillo se partieron por la mitad, así se pudo ver la superficie transversal interior en el SEM.

3.2.7.2. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN

Se sembraron 50000 células en 80 muestras de titanio con los biopolímeros disueltos. Se quería hacer estudios de proliferación y diferenciación para intervalos de 4h, 7 días, 14 días, 21 días y 28 días. En cada intervalo de tiempo se mataban las células de 15 muestras (3 muestras para cada condición: Titanio sin biopolímero, con 1K, con H3, con HRGD y con H4R4). Para el intervalo de 28 días se hicieron 4 series de cada condición utilizando una de éstas para cuantificar la mineralización. También se sembraron células en pocillos sin muestra de titanio para realizar una recta patrón: se sembraron por triplicado 0, 10000, 20000, 40000 y 80000 células, que se mataron al cabo de 4h.

El proceso de matar las células consistió en colocar las muestras en placas de 48 pocillos y añadir 300 μL de Mammalian Protein Extraction Reagent (M-PER). Esto provoca que la membrana de las células se rompa, dejando salir las enzimas (cómo la Lactato deshidrogenasa (LDH)) y los orgánulos. Una vez añadido el M-PER se conservaron a una temperatura de -80°C hasta su análisis.

Para el estudio de la proliferación celular se cuantificó la LDH mediante el kit: Cytotoxicity Detection Kit (LDH), el cual contiene piruvato, NAD^+ y sales de tetrazolium. La LDH transforma el piruvato en lactato con la reducción de NAD^+ . Las sales de tetrazolium con la oxidación del $\text{NADH}+\text{H}^+$ se reducen a formazán, el cual emite luz roja. Midiendo la absorbancia se cuantifica la actividad de LDH existente y a partir de los valores obtenidos se determina el número de células presentes en la disolución, ya que todas la células tienen la misma concentración de LDH.

En el protocolo utilizado para la medición de la LDH, se mezclaron 100 μL de disolución de las muestras con 100 μL de reactivo. Se realizaron un total de 90 reacciones (75 muestras de titanio + 15 disoluciones para la recta patrón) , por lo que se prepararon 10,35 mL de reactivo, mezclando 225 μL de Catalyst (Pote 1 del kit de citotoxicidad LDH) con 10,125 mL de Dye Solution (pote 2 del kit de citotoxicidad LDH).

Para evitar la saturación en el ensayo de actividad las muestras de 14, 21 y 28 días se diluyeron con M-PER a 1/5, 1/10 y 1/20 respectivamente.

Al mezclar los 100 μL de reactivo con 100 μL de las muestras a estudiar (en una placa de 96 pocillos) se observó un cambio de color. Cuando se observan diferencias de colores en la recta patrón es cuando se debe parar la reacción con Stop Solution (pote 4 del kit de citotoxicidad LDH), del cual se añadieron 50 μL en cada pocillo. Para finalizar la reacción enzimática se añaden 50 μL en cada pocillo de la Stop Solution (pote 4 del kit de citotoxicidad LDH).

Una vez parada la reacción se examinó la absorbancia en el espectrofotómetro (**Figura 9**) a una longitud de onda de 492 nm.



Figura 9. Espectrofotómetro utilizado para medir absorbancias.

3.2.7.3. ENSAYO DE DIFERENCIACIÓN

El ensayo de diferenciación se realizó mediante la medición de la actividad de Fosfatasa alcalina (ALP) en las mismas muestras que se midió la actividad LDH. La ALP es una enzima que se encuentra en los osteoblastos y no se encuentra en las rMSCs. Por lo tanto, la detección de ALP indicará que las rMSCs habrán diferenciado a osteoblastos. La actividad de esta enzima aumenta cuando los osteoblastos producen osteoide debido a la producción de vesículas de la matriz, que son unos orgánulos de la membrana extracelular. Esta enzima aumenta los niveles locales de fosfato inorgánico, que es uno de los componentes de la apatita, la fase mineral que forma el hueso.

La ALP convierte el sustrato p-nitrofenilfosfato (pNPP) en p-nitrofenol, el cual da un color amarillo con una longitud de onda de 405 nm. Así, midiendo la absorbancia a esta longitud de onda se puede saber la cantidad de ALP que contienen las muestras.

Para realizar el ensayo primero se hizo la recta patrón con 8 puntos de estudio: 200 ng/mL, 100 ng/mL, 50 ng/mL, 25 ng/mL, 12,5 ng/mL, 6,2 ng/mL, 3,1 ng/mL y 0 ng/mL. Estas diluciones se hicieron en una solución tampón en la que se mezclaron 1,8 mL de agua con 200 μ L del componente B del kit de ALP (dilución 1:10).

En el primer punto (200 ng/mL) se mezclaron 6,8 μ L del componente E del kit (ALP) con 333,2 μ L de la solución tampón (dilución 1:5). Para hacer las diluciones de los siguientes puntos se han mezclado 170 μ L de la solución tampón con 170 μ L de la

dilución del punto anterior, excepto la del punto de 0 ng/mL en que toda la solución ha sido de la solución tampón. De cada punto se han cogido 3 muestras de 50 μ L y se han depositado en una placa de 96 pocillos.

El ensayo en la dilución de las muestras se ha hecho mezclando 50 μ L de la muestra con 50 μ L del componente A del kit (pNNP) por triplicado en placas de 96 pocillos. Las muestras de 14, 21 y 28 días se han diluido en M-PER en una relación 1:5, 1:10 y 1:20 respectivamente.

Se han dejado las diluciones en reacción a 37°C durante 30 minutos y seguidamente se ha parado la reacción con 50 μ L del componente C del kit (stop solution).

Se ha medido la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm. La recta patrón nos da la relación ng de ALP vs. absorbancia. Con la ecuación de esta recta y la absorbancia de las muestras se puede determinar la cantidad de ALP en cada muestra, la cual se dividió por el número de células a cada intervalo (determinado con el ensayo de LDH) y el tiempo de incubación con reactivo (30 minutos).

3.2.7.4. ENSAYO DE MINERALIZACIÓN

Para determinar la mineralización de las células se ha hecho un ensayo con Alizarin Red S (AR-S). El AR-S tiñe los depósitos de calcio que han creado las células. El principio de la unión del calcio es un proceso de quelación de iones de calcio con el colorante, que da un color rojo al complejo [26] (*Figura 10*).

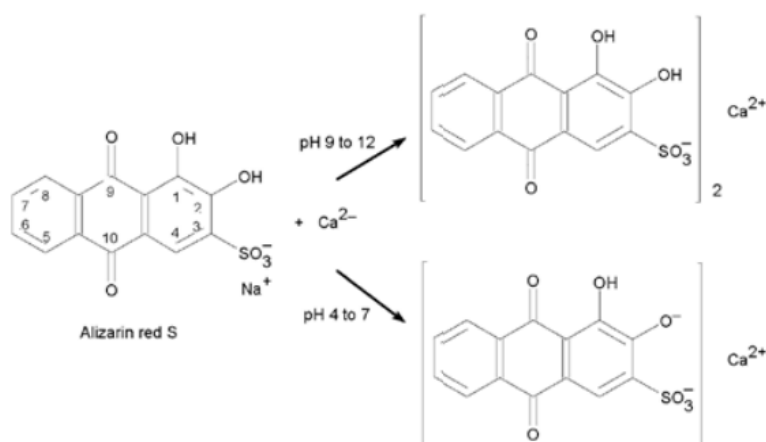


Figura 10. Proceso de quelación de iones de calcio con AR-S [26].

Este ensayo se realizó en cinco de las muestras (una para cada condición) que habían estado 28 días en incubación. El protocolo seguido para realizar el ensayo fue el siguiente:

- 1) Se lavaron las muestras con PBS dos veces.
- 2) Se fijaron las células con formaldehyde al 4% durante 15 minutos. Se prepararon 5 mL de la solución (1 mL para cada muestra), por lo tanto se mezclaron 1,25 mL de formaldehyde al 16% con 3,75 mL de PBS.
- 3) Se lavaron las muestras con agua destilada dos veces.
- 4) Se añadió 0,5 mL de solución AR-S 40 mM y se dejaron durante 20 minutos en agitación.
- 5) Se retiró la solución y se lavaron las muestras con agua 6 veces, también en agitación, hasta quedar completamente transparente.
- 6) Se añadieron 300 μ L de la solución tampón cetylpyridinium chloride (CPC) durante 30 minutos.
- 7) Se añadieron 100 μ L de la dilución en una placa de 96 pocillos para tener tres muestras de cada dilución y crear menos error en el ensayo.
- 8) Se leyó la absorbancia de las diluciones en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm.
- 9) El resultado obtenido se dividió por el número de células obtenido en el ensayo de proliferación a 28 días.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. IMPRESIÓN 3D

En la **Figura 11** se observan dos de las muestras obtenidas por impresión 3D de diámetro 13 mm y altura 5mm.

Las muestras obtenidas salieron homogéneas, sin colapso y con los poros bien definidos. Como ya demostró Diego Torres en su proyecto de fin de máster "Desarrollo y biofuncionalización de una estructura porosa de titanio obtenida mediante impresión 3D" [23], con estas estructuras se ha conseguido mejorar las propiedades mecánicas del titanio.

Se fabricaron un total de 92 muestras y se utilizaron 4 para el ensayo de adhesión, 75 para el de proliferación y diferenciación (se usaron las mismas para los tres ensayos) y en el de mineralización se usaron 5 muestras.

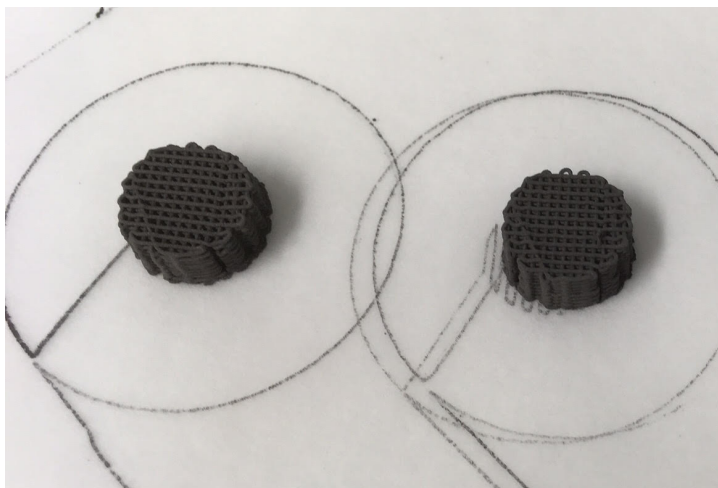


Figura 11. Estructuras porosas de titanio obtenidas mediante impresión 3D.

4.2. CARACTERIZACIÓN DEL RECUBRIMIENTO MEDIANTE BIOPOLÍMEROS ELR's

Se ha supuesto que los biopolímeros penetraron a través de los poros de las muestras y su correcta adhesión debido al éxito de ensayos que lo demuestran en el proyecto de fin de máster de Diego Torres " Desarrollo y biofuncionalización de una estructura porosa de titanio obtenida mediante impresión 3D" [23] y en la tesis de Marta González "Optimización de aleaciones β -Ti con bajo módulo elástico para aplicaciones biomédicas" [17].

Este ensayo consiste en la introducción del biopolímero HRGD+F (Dominio RGD + fluoresceína) sobre una muestra previamente silanizada. Se observó mediante la lupa Fluo Stereoscope Leica del Instituto de Bioingeniería de Catalunya (IBEC). Siguiendo las indicaciones del grupo BIOFORGE (proveedor del biopolímero) se realizó una dilución 1:1 con el biopolímero HRGD para obtener mejores resultados de fluorescencia [23].

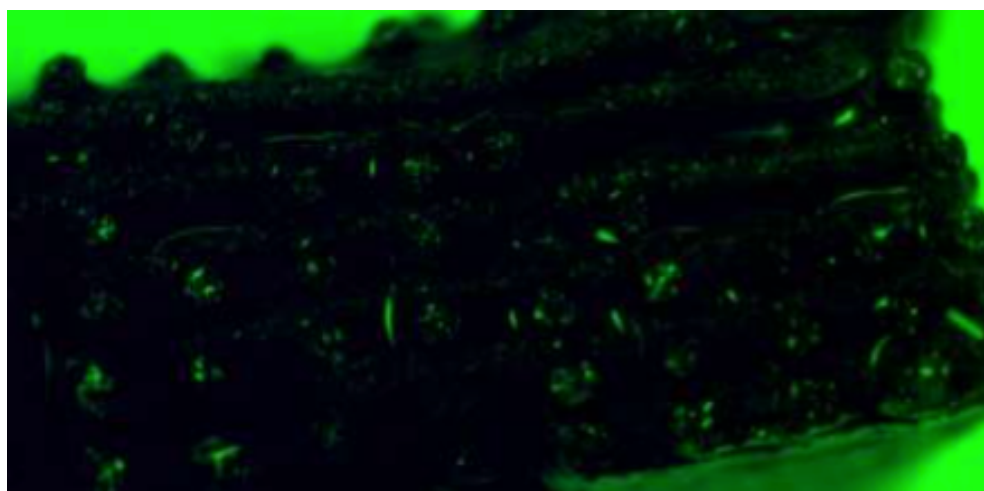


Figura 12. Ensayo de fluorescencia de la superficie de rotura de la muestra [23].

Los puntos verdes que se observan en la **Figura 12** representan el biopolímero HRGD+F, por lo tanto se concluye que los biopolímeros han penetrado en la estructura de titanio y que se han adherido correctamente [23].

4.3. ENSAYOS CELULARES *IN VITRO*

4.3.1. ENSAYO DE ADHESIÓN

En primer lugar se observó al SEM la superficie exterior por donde penetraron las células y luego el interior de las estructuras con un corte transversal para ver si habían penetrado dentro de las estructuras de titanio.

Zona superficial exterior

En la **Figura 13** se observa la distribución superficial de las células en cada uno de los biopolímeros al SEM a 75 aumentos. Se señalan algunas de las células adheridas con círculos rojos. No se aprecian demasiadas diferencias entre los diferentes biopolímeros, pero sí que se observa que en todas se han adherido muchas células.

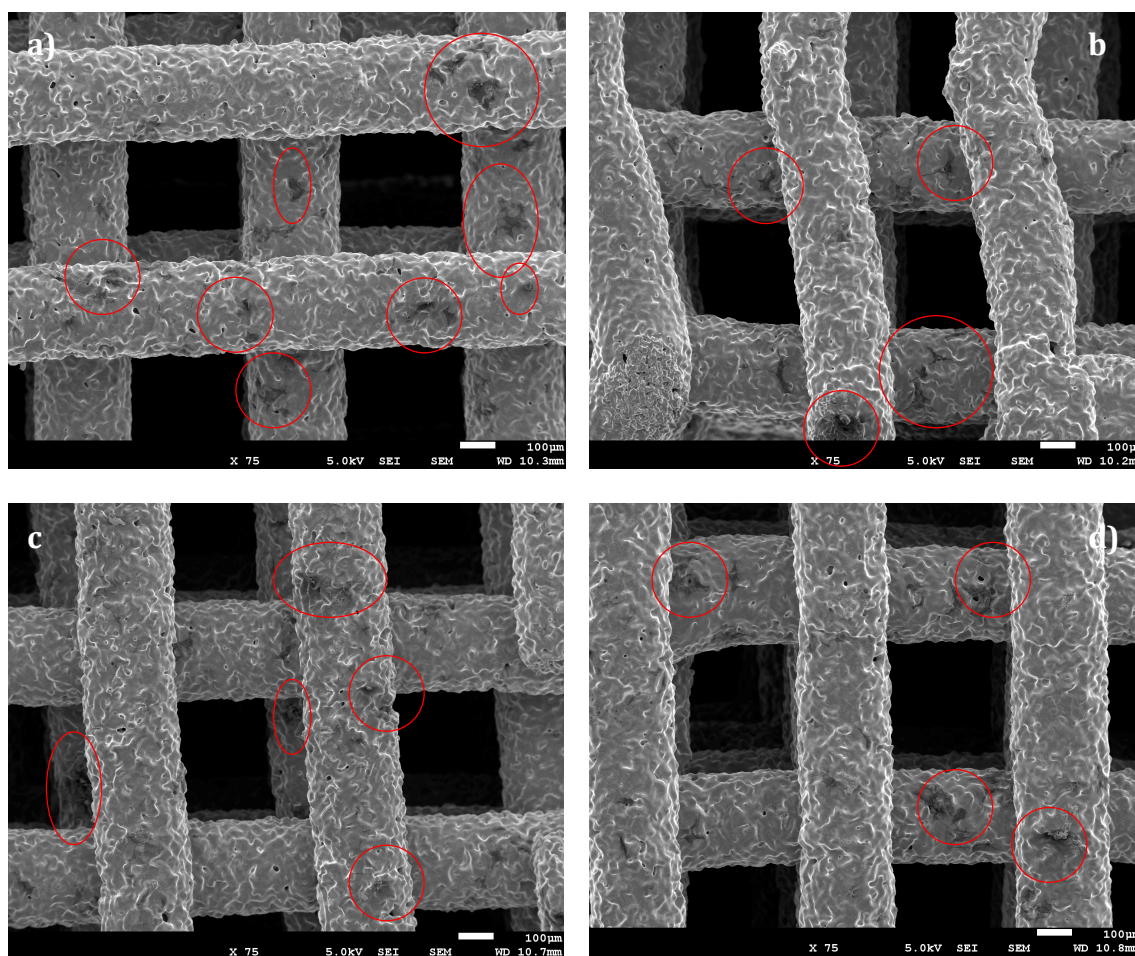


Figura 13. Imágenes al SEM a x 75 de la superficie de las muestras funcionalizadas con a) 1K b) H3 c) HRGD d) H4R4.

En la siguiente imagen (**Figura 14**) se observan más detalladamente para las mismas muestras algunas células a 1500 aumentos en el SEM. En la muestra del biopolímero de control 1K la célula que se muestra tiene una forma más redondeada que las otras, en los otros biopolímeros las células están más estiradas. Que las células estén estiradas significa que hay una mejor adhesión o afinidad con la superficie a la cual se adhieren. La presencia de secuencias RGD en el biopolímero HRGD y en el biopolímero H4R4 favorece la adhesión celular y por lo tanto el estiramiento de las células [28], [29], [51]. Los biopolímeros ELRs están diseñados con el objetivo de imitar la matriz extracelular, lo que provoca un mayor estiramiento celular[37]. Por lo tanto, en el biopolímero 1K las células tienen una morfología más redondeada porque al tener solo las secuencias de elastina, sin ningún motivo celular, las células no se adhieren tanto en el material.

Entre estos tres otros biopolímeros no se observa gran diferencia en cuanto a la morfología de las células sobre la superficie.

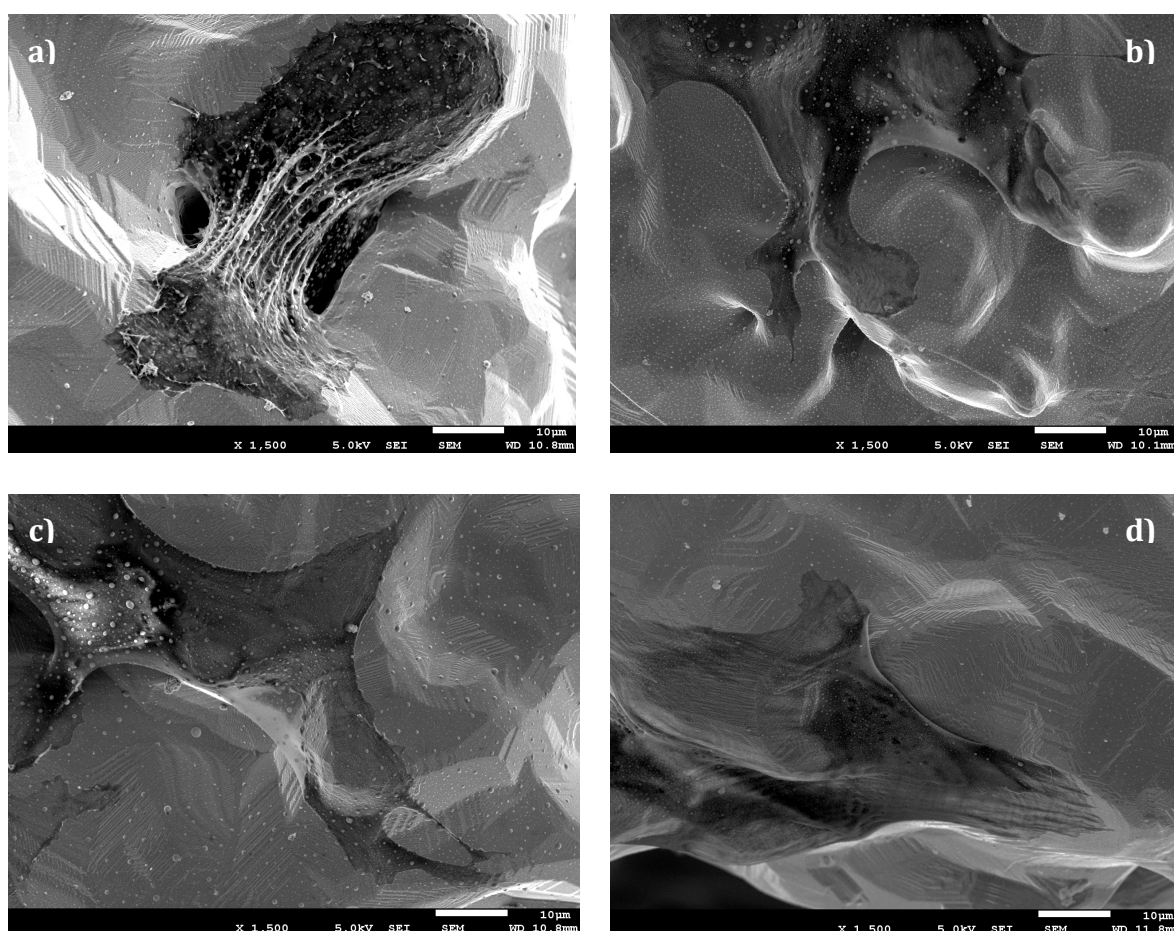


Figura 14. Imágenes al SEM a x 1500 de la superficie de las muestras funcionalizadas con a) 1K b) H3 c) HRGD d) H4R4.

Zona transversal interior

En la zona transversal interior de las muestras no se observan tantas células como en la superficie, pero sí se puede determinar que han penetrado dentro de la muestra porosa de titanio para cada tipo de biopolímero. Se esperaba encontrar más células en el interior, pero se tiene que tener en cuenta que el método para romper las estructuras (con nitrógeno líquido) es un método agresivo y puede haber afectado en los resultados. En la **Figura 15** se señalan con un círculo rojo algunas de las células encontradas en el interior de las estructuras porosas. Las flechas indican la dirección de penetración de las células.

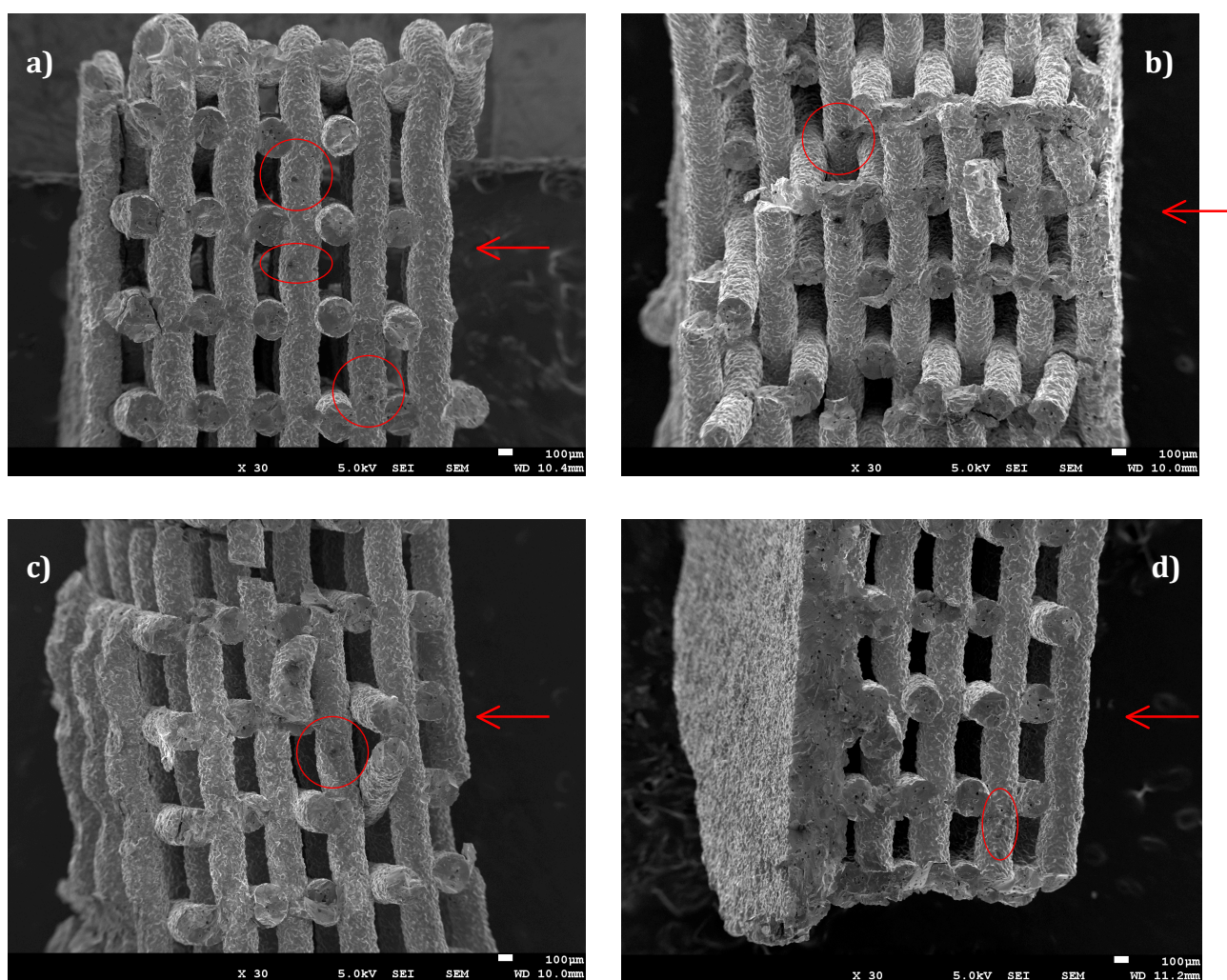


Figura 15. Imágenes al SEM a x 30 de la zona transversal interior de las muestras funcionalizadas con a) 1K b) H3 c) HRGD d) H4R4.

En la **Figura 16** se observan las muestras a 500 aumentos y se ve claramente que el área de las células es mucho más pequeña en la muestra funcionalizada con 1K que en el resto de biopolímeros, ya que no contiene ningún motivo celular. Por lo que se observa parece que en la muestra que se han formado más prolongaciones de la célula ha sido en la de HRGD y en la que menos (entre estos 3 biopolímeros) ha sido la muestra con H3 ya que el motivo celular que contiene favorece la mineralización y no la adhesión. Este resultado tiene sentido ya que el biopolímero HRGD contienen una secuencia RGD la cual promueve la adhesión celular.

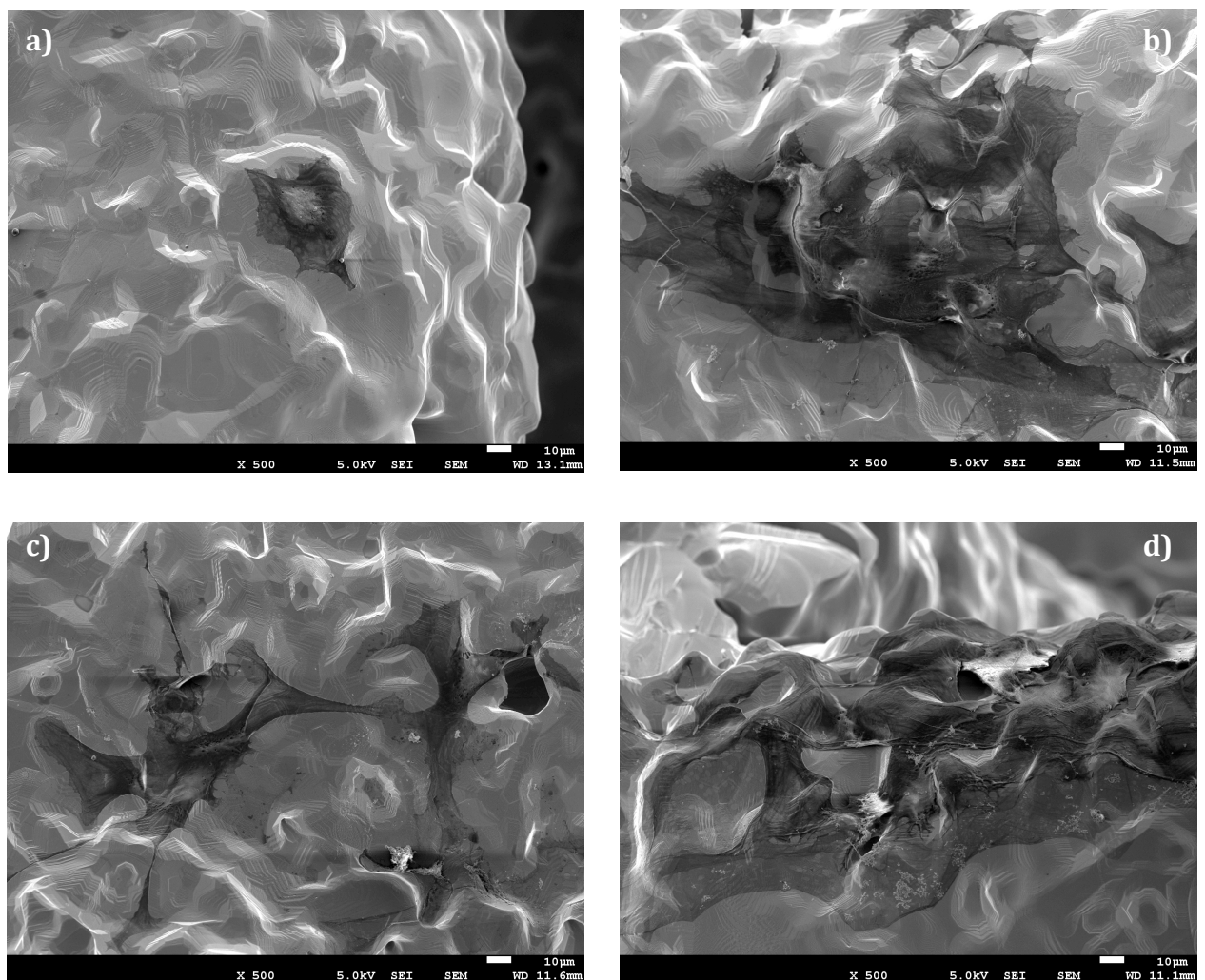


Figura 16. Imágenes al SEM a x 500 de la zona transversal interior de las muestras funcionalizadas con a) 1K b) H3 c) HRGD d) H4R4.

4.3.2. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN

En la **Figura 17** se observa el ensayo de proliferación una vez parada la reacción de las diluciones para la recta patrón, las de 4h, 7 días, 14 días, 21 días y 28 días.

La LDH transforma el piruvato en lactato con la reducción de NAD^+ . Las sales de tetrazolium con la oxidación del $\text{NADH} + \text{H}^+$ se reducen a formazán, el cual emite luz roja. Midiendo la absorbancia se cuantifica la actividad de LDH existente y a partir de los valores obtenidos se determina el número de células presentes en la disolución, ya que todas la células tienen la misma concentración de LDH.

En las diluciones para la recta patrón se ve mucha diferencia de color entre las muestras que tienen 0, 10000, 20000, 40000 y 80000 células sembradas.

En las muestras de 4h se observa muy poco color rojo. Entre las de 7 días, 14 días, 21 días y 28 días no se ve gran diferencia de color, pero hay que tener en cuenta que las de 14, 21 y 28 días se habían diluido para no que no hubiera saturación al medir la absorbancia.

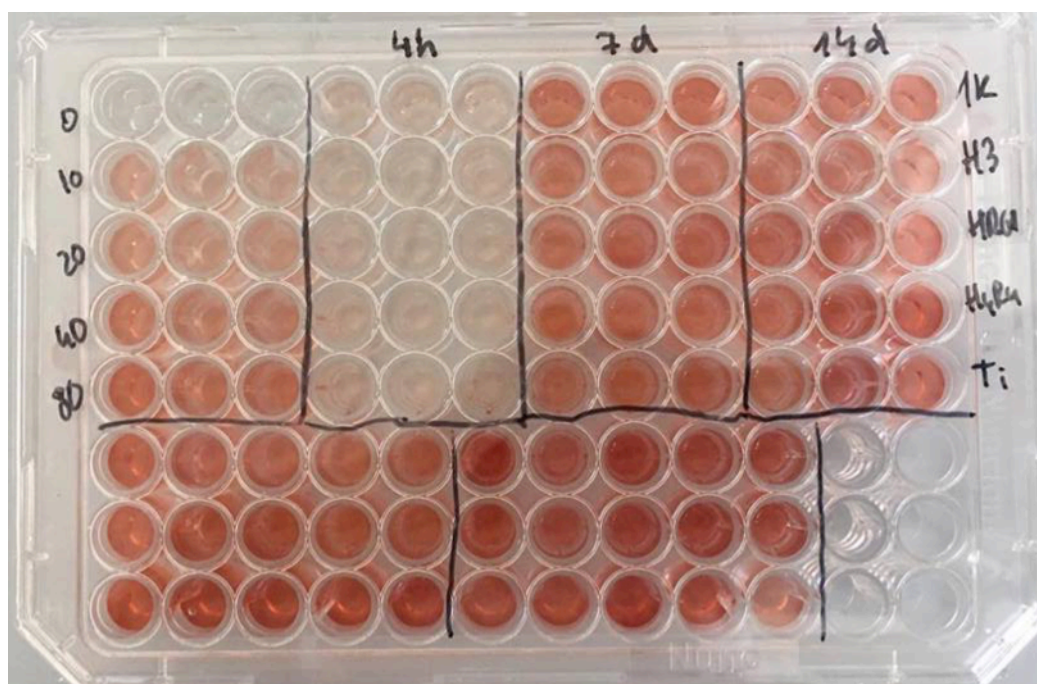


Figura 17. Diluciones una vez parada la reacción de la recta patrón, muestras de 4h, 7 días, 14 días, 21 días y 28 días (de arriba a abajo y de izquierda a derecha).

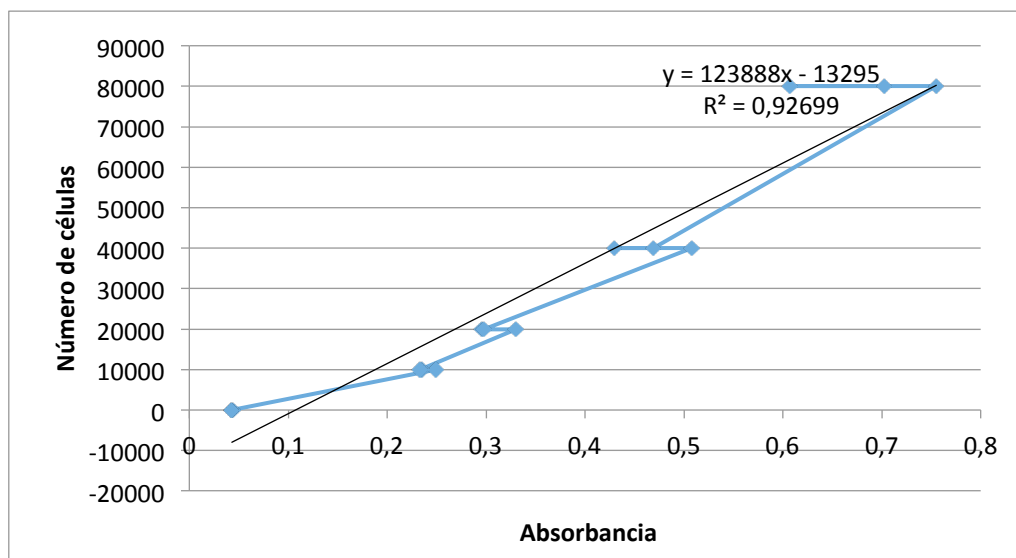


Gráfico 1. Recta patrón del ensayo de proliferación.

En el **Gráfico 1** se observa la recta patrón número de células vs. absorbancia. A partir de la ecuación $y = 123.888x - 13.295$ y con las absorbancias de todas las otras muestras se calcula el número de células en cada muestra. En las muestras de 14, 21 y 28 días se ha multiplicado el resultado por el factor de dilución para obtener el número real de células que había en las muestras.

En la **Tabla 4** y en el **Gráfico 2** se muestran los resultados obtenidos: el número de células medio en cada muestra a los diferentes intervalos de tiempo de incubación.

Tabla 4. Número de células para cada intervalo de tiempo en las diferentes condiciones.

Número de células					
	1K	H3	HRGD	H4R4	Ti
4h	4.049,3	3.677,7	3.264,7	4.173,2	3.801,5
7d	81.520,6	63.061,3	85.113,4	81.974,9	53.604,5
14d	298.994,6	272.978,1	396.246,7	400.169,8	254.394,9
21d	845.352,2	735.917,8	745.415,9	694.621,8	725.180,9
28d	1.831.936,8	1.380.158,6	2.167.260,3	1.698.137,8	1.623.392,0

Observamos que al cabo de 4h de incubación las células habían proliferado muy poco en todas las condiciones. Al único intervalo de tiempo que se observan diferencias

significativas es a los 28 días. Las células que proliferan más a lo largo de los días de incubación son las de las muestras funcionalizadas con HRGD, con un número de células al cabo de 28 días de 2.167.260,3. Esto se debe a que el polímero HRGD contiene una secuencia RGD, el cual estimula la proliferación de las células. Las que han proliferado menos han sido las de las muestras funcionalizadas con H3, con un número de células al cabo de 28 días de 1.380.158,6. El biopolímero H3 tiene un motivo celular que estimula la diferenciación, así que puede ser por eso que no haya proliferado tanto como en las otras condiciones. En el periodo de 28 días entre los otros biopolímeros no hay demasiadas diferencias.

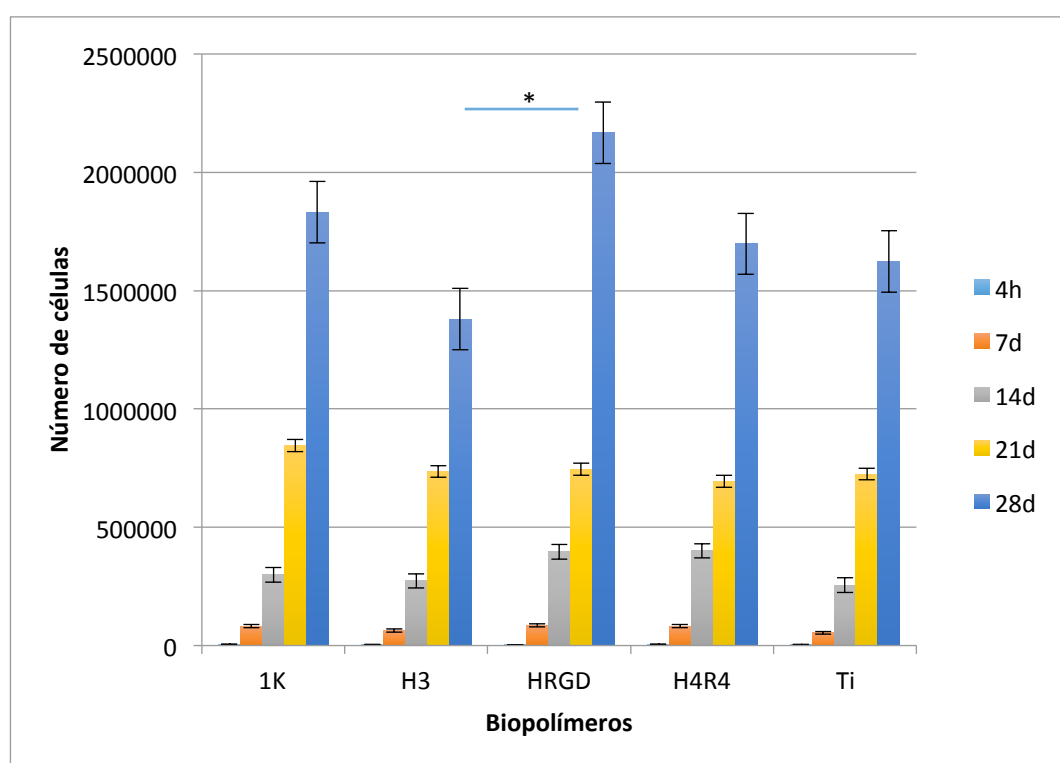


Gráfico 2. Número de células vs. Biopolímeros en diferentes tiempos de incubación.

4.3.3. ENSAYO DE DIFERENCIACIÓN

En la **Figura 18** y la **Figura 19** se observa el ensayo de detección de ALP una vez parada la reacción. Se observa la degradación de color amarillo en las muestras para realizar la

recta patrón. Como ya se ha mencionado anteriormente el color amarillo es consecuencia de la transformación del sustrato p-nitrofenilfosfato (pNPP) en p-nitrofenol gracias a la presencia de la enzima ALP. El nitrofenol emite un color amarillo del cual se ha medido las absorbancias para obtener los ng de ALP de las diluciones. En las muestras de 4h ha salido un color un poco rosado, que se ha supuesto que corresponde al medio de cultivo residual. Al haber diluido las muestras de 14, 21 y 28 días el color amarillo en las muestras de 28 días se aprecia muy poco, pero sí que entra dentro del rango de absorbancias de la recta patrón.

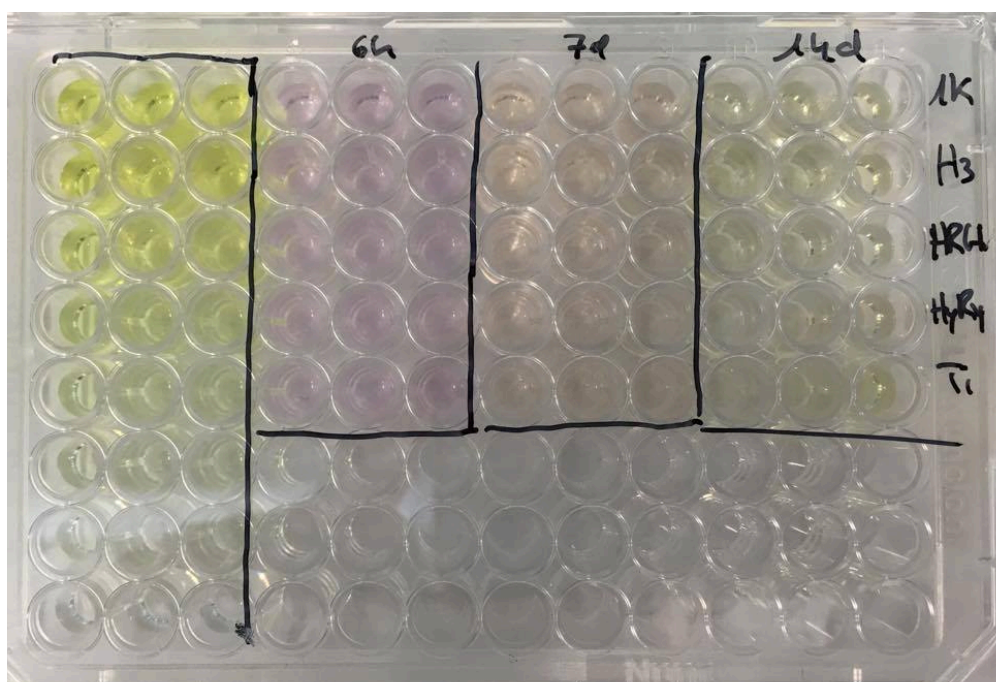


Figura 18. Dilución una vez parada la reacción de la recta patrón, muestra a 4h, 7 días y 14 días (de izquierda a derecha).

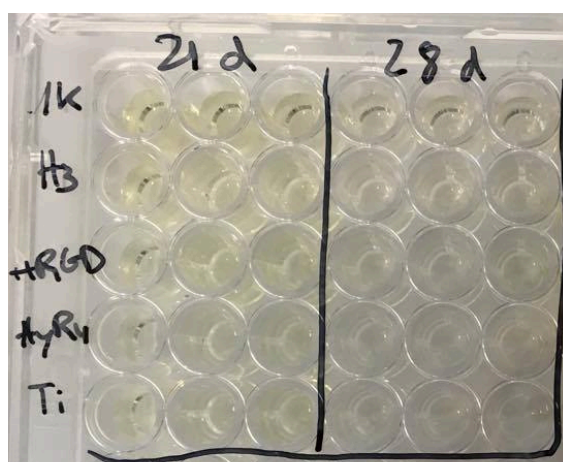


Figura 19. Dilución una vez parada la reacción para 21 y 28 días (de izquierda a derecha).

En el **Gráfico 3** se observa la recta patrón obtenida del ensayo de detección de ALP con una ecuación $y = 1,5374x - 0,1646$, dónde y representan los ng de ALP y x la absorbancia. A partir de esta recta se pueden calcular los ng de ALP para todas las muestras a partir de su absorbancia.

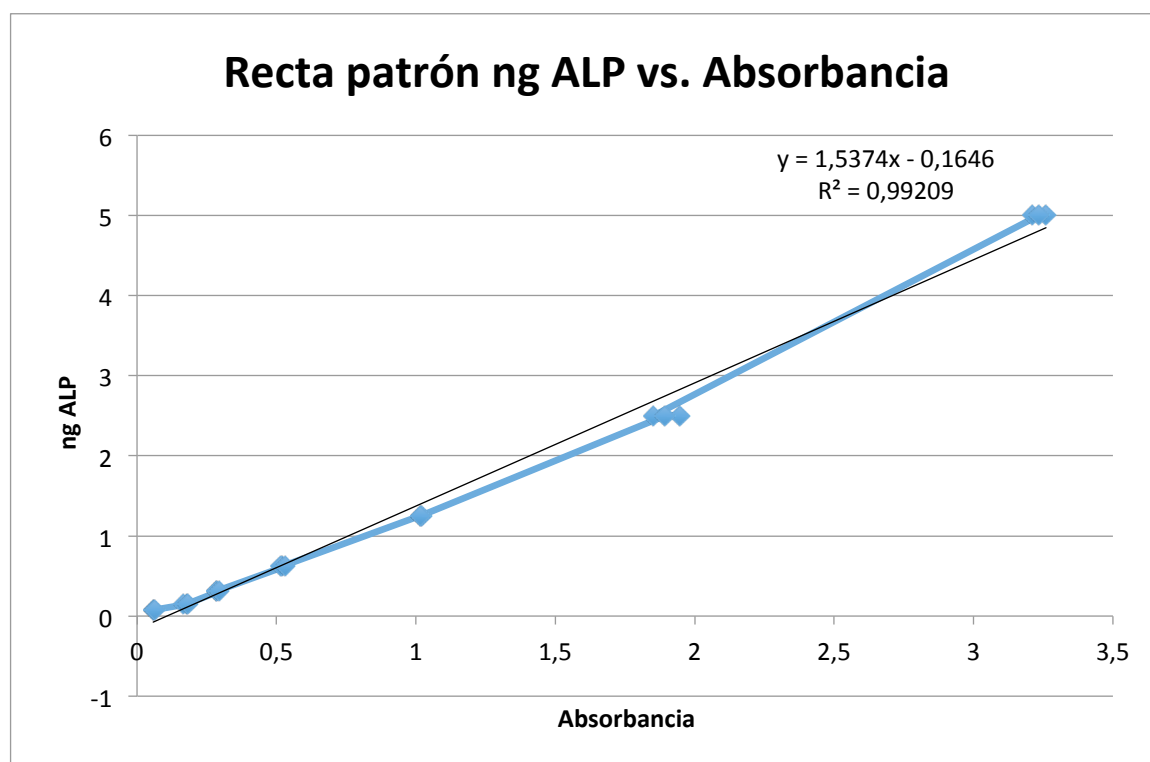


Gráfico 3. Recta patrón ng ALP vs. Absorbancia del ensayo de diferenciación.

En la **Tabla 5** y en el **Gráfico 4** se observan los resultados obtenidos en el ensayo de detección de ALP. Los ng de ALP se han dividido por el número de células en cada periodo de tiempo obtenido en el ensayo de proliferación, y por el tiempo de reacción en la incubadora (30 min). En el caso de las muestras de 14, 21 y 28 días se ha multiplicado el resultado por el factor de dilución correspondiente en cada caso.

Los ng de ALP para todas las muestras de 4h y a partir de la ecuación de la recta patrón han salido con valores negativos, por esta razón se ha considerado que la cantidad de ALP era de un valor de 0, es decir que al cabo de 4h las células aún no habían diferenciado a osteoblastos en ninguna de las condiciones.

A los 14 días de incubación se observa un pico con los valores máximos de ALP. En la condición que ha habido más cantidad de ALP a los 14 días ha sido las muestras funcionalizadas con H3, seguido del titanio sin funcionalizar, 1K, HRGD y finalmente H4R4. Que las muestras con más diferenciación hayan sido las funcionalizadas con H3 tiene mucho sentido, ya que este biopolímero contiene un motivo celular que promueve la mineralización. A su vez, concuerda con los resultados obtenidos en el ensayo de mineralización con AR-S. Respecto al resto de muestras los resultados no han sido los esperados, ya que no corresponden con los resultados del ensayo de mineralización, y tendrían que coincidir ya que si las células mineralizan también tienen que diferenciar. El resultado más sorprendente es el de la muestra de titanio sin funcionalizar ya que presenta más diferenciación que la mayoría de biopolímeros. Este resultado debe ser consecuencia de algún error porque los biopolímeros son bioactivos mientras que el titanio no. Además las muestras funcionalizadas con H4R4 han sido las que han diferenciado menos, cuando en principio el motivo celular que contiene este biopolímero promueve tanto la adhesión como la mineralización, y hay contradicciones respecto los resultados del ensayo de mineralización. En otros estudios se ha demostrado que el titanio sin funcionalizar presenta menos diferenciación que en el titanio funcionalizado [17], [23], [27].

La cantidad de ALP a partir de los 14 días disminuye en todas las condiciones como era de esperar, ya que entonces aumenta la mineralización.

Tabla 5. ng ALP/número de células*30 minutos para cada intervalo de tiempo.

ng ALP/núm. cells*30min					
	1K	H3	HRGD	H4R4	Ti
4h	0	0	0	0	0
7d	1,37E-07	1,80E-07	1,21E-07	1,28E-07	1,85E-07
14d	1,79E-07	2,70E-07	1,28E-07	1,04E-07	1,97E-07
21d	1,44E-07	1,63E-07	1,58E-07	1,13E-07	1,60E-07
28d	5,66E-08	6,12E-08	5,15E-08	4,02E-08	5,20E-08

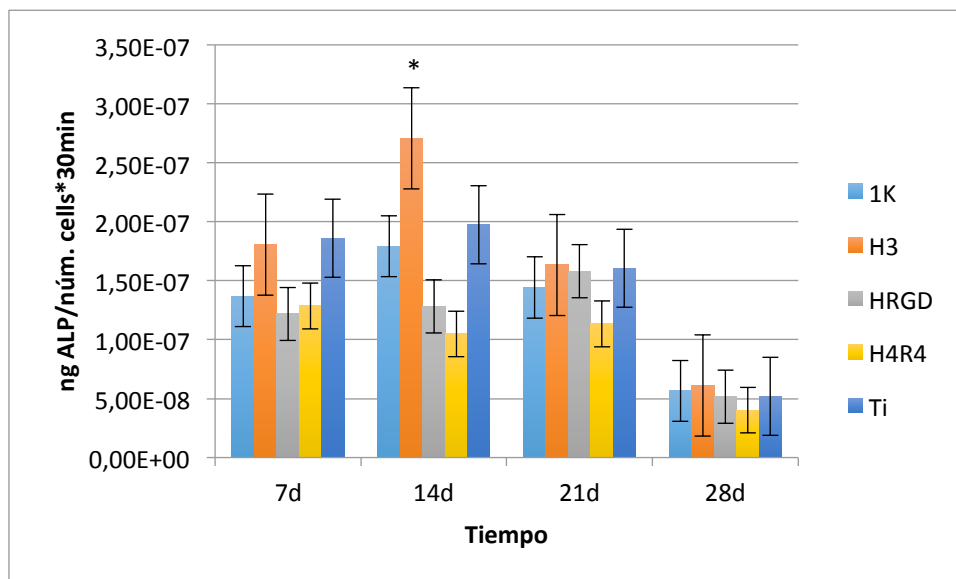


Gráfico 4. ng de ALP/número de células*30 minutos para cada intervalo de tiempo.

4.3.4. ENSAYO DE MINERALIZACIÓN

En la **Figura 20** se observan las diluciones una vez retirado el AR-S y añadido la solución tampón cetylpyridinium chloride (CPC) después de 30 minutos en agitación. Se puede distinguir un color menos intenso en las diluciones de la muestra de titanio sin funcionalizar, y entre las otras diluciones no se observan diferencias significativas.

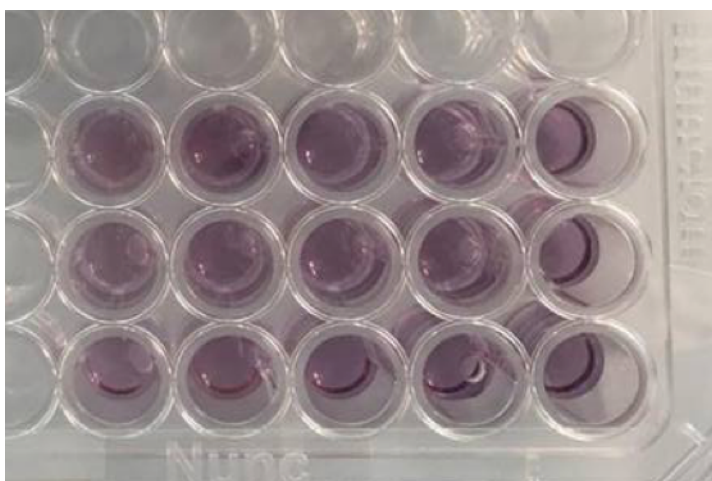


Figura 20. Diluciones finales del ensayo con AR-S de Titanio, H4R4, HRGD, H3 y 1K (de izquierda a derecha).

Tabla 6. Absorbancia en las diferentes condiciones.

	Ti	H4R4	HRGD	H3	1K
Media absorbancia	0,246	0,33766	0,36166	0,35933	0,33166
Media absorbancia/ núm células	1,51E-07	1,98E-07	1,66E-07	2,60E-07	1,81E-07

En la **Tabla 6** se muestran los resultados de absorbancia obtenidos después del análisis en el espectrofotómetro. La mayor absorbancia es la del HRGD, pero se tiene que tener en cuenta el número de células que había en la muestra, ya que si hay más células también habrá más deposiciones de calcio y quizás la mineralización de cada célula es menor. Para normalizar los valores obtenidos se ha dividido la absorbancia por el número de células que se ha determinado en el ensayo de proliferación para el intervalo de 28 días.

Los resultados normalizados por el número de células, indican que la muestra que ha mineralizado más ha sido la de H3, seguida de H4R4, 1K, HRGD y finalmente el titanio sin funcionalizar.

Estos resultados coinciden con la tipología de motivos existentes en el H3 y el H4R4 ya que promueven la mineralización. En contra posición, las muestras con el titanio sin funcionalizar son las que presentan una menor mineralización ya que al no estar funcionalizado no es bioactivo y no favorece la mineralización de las células.

5. ANÁLISIS DEL IMPACTO AMBIENTAL

En cualquier proyecto hay un impacto en el medio ambiente, en algunos más y otros menos, pero siempre se tiene que hacer un análisis de ello.

5.1. GESTIÓN DE RESIDUOS

En la elaboración de este proyecto se han utilizado materiales tóxicos que no se pueden mezclar con el resto de residuos. Por eso en los laboratorios hay un control muy estricto de la gestión de residuos, que se tienen que almacenar según la **Tabla 7** que se muestra a continuación. Primero se tiene que identificar a qué grupo corresponde el residuo y después almacenarlo en el envase adecuado (todos están etiquetados).

Tabla 7. Tabla de residuos con su almacenaje correspondiente.

Residuo	Almacenaje
Disolventes halogenados	Envase de PP de 5 L
Disolventes no halogenados	Envase de PP de 5 L
Soluciones acuosas	Envase de PP de 0,5 L
Ácidos concentrados	Envase de PP de 0,5 L
Aceites	Envase de PP de 0,5 L
Bases	Envase de PP de 0,5 L
Sólidos metálicos	Envase de PP de 0,5 L
Sólidos	Envase de PP de 5 L

Cuando los envases están llenos hay una empresa que los recoge y realiza el debido procesamiento de cada tipo de residuo.

Los residuos biológicos los gestiona directamente la universidad ya que se generan muchos, con un sistema de autoclave. Una vez pasados por el autoclave ya se puede considerar que los residuos son normales y se pueden tirar al contenedor de residuos.

5.2. CONSUMO DE ENERGÍA

En la realización de este proyecto, aparte de generar residuos, también se ha hecho un consumo de la energía, ya que se han utilizado técnicas como el SEM, la incubadora, el espectrofotómetro o el congelador, que funcionan con el consumo de electricidad.

La electricidad necesaria para el funcionamiento de estos equipos se puede obtener de muchas maneras, pero mayoritariamente se obtiene a partir de combustibles fósiles, los cuales generan dióxido de carbono (CO_2). El CO_2 es un gas muy perjudicial para la atmósfera y uno de los gases responsables del efecto invernadero y el cambio climático.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones sacadas en este proyecto han sido las siguientes:

- Se ha conseguido obtener estructuras porosas de titanio mediante impresión 3D.
- Se ha conseguido sinterizar y eliminar el hidrogel de las muestras de titanio sin que padeciera ningún tipo de corrosión o daño superficial.
- Se ha conseguido adherir los biopolímeros covalentemente con las estructuras porosas de titanio.
- En el ensayo de adhesión celular se ha visto que en todas las muestras funcionalizadas con los distintos biopolímeros las células se han adherido tanto en la superficie como en el interior de las estructuras.
- Se ha visto que la mejor adhesión de las células se ha producido en las muestras funcionalizadas con HRGD ya que se encontraban más estiradas, es decir que eran más afines a la superficie.
- En el ensayo de proliferación se ha demostrado que las células han proliferado en todas las condiciones de ensayo y se observan diferencias significativas a los 28 días de incubación. La mayor proliferación se ha producido en las muestras funcionalizadas con HRGD.
- En el ensayo de diferenciación se observa un pico máximo a los 14 días, con la mayor diferenciación en las muestras funcionalizadas con H3.
- En el ensayo de mineralización se ha visto que las células que han mineralizado más han sido las que se encontraban en las muestras funcionalizadas con H3, seguidas de las funcionalizadas con H4R4.
- En trabajos futuros se debería realizar los ensayos a diferentes concentraciones de biopolímero para determinar la concentración óptima de biopolímero.

- Cómo trabajo futuro también se podría hacer un estudio de la adhesión al cabo de 28 días de incubación para ver si se observan más diferencias entre las diferentes condiciones.

7. ANÁLISIS ECONÓMICO

En este capítulo se analiza el coste aproximado real de este proyecto, tanto desde el punto de vista de los materiales utilizados, los equipos y ensayos realizados y las horas de trabajo invertidas en el proyecto. A continuación (**Tabla 8**) se describen los presupuestos detalladamente, con un coste aproximado total de 10.139,55 €.

Tabla 8. Presupuesto detallado del proyecto.

Concepto	Precio	Ensayos realizados/ Horas invertidas/ Número de muestras	Coste (€)
SEM	157 €/h	4h	628
Horno	30 €/h	10 min	5
Estufa	3 €/h	28 días	2.016
Pipetas	150 €/unidad	3 unidades	450
Polvo de titanio	173 €/0,5kg	0,12 kg	41,52
Pluronic	71 €/0,5kg	0,03 kg	4,26
FBS	20 €/500mL	100 mL	4
Advanced DMEM	23 €/0,5L	0,37 L	17,02
L-Glutamina	10 €/100mL	0,5 mL	0,05
Penicilina/Estreptomicina	10 €/100mL	0,5 mL	0,05
HEPES	60 €/100mL	10 mL	6
Tolueno anhídrido	107 €/L	0,04 L	4,28
PBS	110 €/100 pastillas	1 pastilla	1,1
Nitrógeno líquido	1 €/L	0,5 L	0,5

Kit LDH	572 €/2000 reacciones	75 reacciones	21,45
Kit ALP	271 €/1000 reacciones	75 reacciones	20,32
Biopolímeros	Proporcionados por BIOFORGE	-	0
Sinterización	Hecha por AMES	-	0
Activación por plasma de oxígeno	85 €/tratamiento	16 tratamientos	1.360
rMSCs	700 €/1.000.000 células	*	100
Dirección del proyecto	90 €/h	50 h	4500
Técnico de SEM	80 €/muestra	12 muestras	960
Coste total			10.139,55

*Las células proliferan, es decir que se multiplican muchas veces, por eso no se puede saber el coste exacto y se ha estimado.

REFERENCIAS

- [1] Gerard J. Tortora & Bryan Derrickson. "Principios de anatomía y fisiología". Capítulo VI en *Sistema esquelético: el tejido óseo*. 2013. Reimpresión: Editorial medica panamericana, 2015.
- [2] H. Abe, K. Hayashi, M. Sato, "Data book on mechanical properties of living cells, tissues, and organs", Editorial Springer.
- [3] D. Williams, "On the mechanisms of biocompatibility", *Biomaterials*, núm. 29, 2008: 2941-2953.
- [4] F.J. Gil, J.A. Planell, "Aplicaciones biomédicas del titanio y sus aleaciones", *Biomedical-originales*
- [5] J.A. Disegi, "Titanium alloys for fracture fixation implants", *Injury*, núm. 31 (4), December 2000: D14-D17.
- [6] M. Arciniegas, J.M. Manero, J. Peña, F.J. Gil, J.A. Planell, "Estudio comparativo de módulos elásticos mediante las técnicas de ultrasonidos y nanoindentación para nuevas aleaciones de Ti", *Anales de la mecánica de fractura*, vol. 2, 2007.
- [7] B. Arifvianto, J. Zhou, "Fabrication of Metallic Biomedical Scaffolds with the Space Holder Method: A Review", *Materials*, vol. 7(5), 2014: 3588-3622.
- [8] C.E. Wen, M. Mabuchi, Y. Yamada, K. Shimojima, Y. Chino, T. Asahina, "Processing of biocompatible porous Ti" *Scr. Mater*, núm. 45, 2001: 1147-1153.
- [9] M. Agarwala, J. Beaman, H. Marcus, J. Barlow, "Direct selective laser sintering of metals", *Rapid Prototyping Journal*, 2005: 20-26.
- [10] J-P. Kruth, P. Mercelis, J. Van Vaerenbergh, L. Froyen, M. Rombouts, "Binding mechanisms in selective laser sintering and selective laser melting", *Rapid Prototyping Journal*, vol. 11 (1), 2005: 26-36.
- [11] P. Heinl, A. Rottmair, C. Körner, R. F. Singer, "Cellular titanium by Selective Electron Beam Melting", *Advanced Engineering Materials*, vol. 9 (5), 2007: 360-364.

- [12] I. Gibson, D. Rosen & B. Stucker. "Additive Manufacturing Technologies". Capítulo II en *Development of Additive Manufacturing Technology*. Editorial Springer, 2014.
- [13] S. Rammelt, T. Illert, S. Bierbaum, D. Scharnweber, H. Zwipp, W. Schneiders, "Coating of titanium implants with collagen, RGD peptide and chondroitin sulfate", *Biomaterials*, vol. 27 (32): 5561– 71.
- [14] H.L. Graf, S. Stoeva, F. Armbruster, J. Neuhaus, H. Hilbig, "Effect of bone sialoprotein and collagen coating on cell attachment to TIGER and pure titanium implant surfaces" *Int J Oral Maxillofac Surg*, vol. 37 (7), 2008: 634–40.
- [15] V.P. Zhdanov, B. Kasemo, "Monte Carlo Simulation of the Kinetics of Protein Adsorption", *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, vol. 30, 1998: 177–182.
- [16] P. Schaffner, M. Dard, "Structure and function of RGD peptides involved in bone biology", *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 60 (9), 2003: 119-132.
- [17] González Colominas, Marta. "Optimización de aleaciones β -Ti con bajo módulo elástico para aplicaciones biomédicas". Tesis para optar al grado de Doctor por la Universitat Politècnica de Catalunya.
- [18] J.C. Rodríguez-Cabello, et al., "Genetic engineering of protein-based polymers: The example of elastinlike polymers, in Ordered Polymeric Nanostructures at Surfaces". 2006, Springer. p. 119-167.
- [19] T. Smart, et al., "Block copolymer nanostructures", *Nano Today*, vol. 3 (3), 2008: 38-46.
- [20] S. Nie, W. L. W. Hsiao, W. Pan, and Z. Yang, "Thermoreversible Pluronic F127-based hydrogel containing liposomes for the controlled delivery of paclitaxel: in vitro drug release, cell cytotoxicity, and uptake studies", *Int. J. Nanomedicine*, vol. 6, (1), Enero 2011: 151–66.
- [21] R. Ivanova, B. Lindman, P. Alexandridis, "Evolution in Structural Polymorphism of Pluronic F127 Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide) Block Copolymer in Ternary

Systems with Water and Pharmaceutically Acceptable Organic Solvents: From “Glycols” to “Oils””, *Langmuir*, vol. 16 (23), 2000: 9058-9069.

[22] C. Herranz-Diez, C. Mas-Moruno, S. Neubauer, H. Kessler, F. J. Gil, M. Pegueroles, J. M. Manero, and J. Guillem-Marti, “Tuning Mesenchymal Stem Cell Response onto Titanium–Niobium–Hafnium Alloy by Recombinant Fibronectin Fragments,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2016.

[23] Torres Garrido, Diego. "Desarrollo y biofuncionalización de una estructura porosa de titanio obtenida mediante impresión 3D". Trabajo de fin de máster en Ingeniería Biomédica en la Universitat Politècnica de Catalunya.

[24] X. Liu, K. Chu, C. Ding, "Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications", *Materials Science and Engineering*, vol. 47, 2004: 49-121.

[25] X. Chen, P. Sevilla, C. Aparicio, "Surface biofunctionalization by covalent co-immobilization of oligopeptides", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 107, Julio 2013: 189-197.

[26] A. Gregory, W. Grady, A. Peister, D. Prockop, "An Alizarin red - based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction", *Analytical Biochemistry*, vol. 329, 2004: 77-84.

[27] E. Tejeda-Montes, A. Klymov, M.R. Nejadnik, M. Alonso, J.C. Rodríguez-Cabello, X.F. Walboomers, A. Mata, "Mineralization and bone regeneration using a bioactive elastin-like recombinamer membrane", *Biomaterials*, vol. 35, 2014: 8339-8347.

